

Antistafilokokni učinak *Lactiplantibacillus plantarum* sojeva iz mikrobiote majčinog mlijeka

Rak, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:193478>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Helena Rak

ANTISTAFILOKOKNI UČINAK
Lactiplantibacillus plantarum
SOJEVA IZ MIKROBIOTE
MAJČINOŠ MLIJEKA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak, te uz pomoć dr. sc. Katarine Butorac i Nine Čuljak, mag. ing. biotechn.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

ZAHVALA

Najprije se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Jasni Novak na pomoći, savjetima i usmjeravanju u cjelokupnoj realizaciji diplomskog rada. Veliko hvala dr. sc. Katarini Butorac i Nini Čuljak mag. ing. biotechn. na velikoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada te kolegici Jani s kojom sam provodila dane u laboratoriju.

Posebno hvala mojim roditeljima na neizmjerljivoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog studija. Na kraju hvala mom Ardenu, mojoj najvećoj motivaciji, bez kojeg ništa ne bi bilo isto.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

ANTISTAFILOKOKNI UČINAK *Lactiplantibacillus plantarum* SOJEVA IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

Helena Rak, univ. bacc. ing. biotechn.
0058212535

Sažetak: S aspekta mikrobne ekologije, majčino mlijeko se može promatrati kao ekosustav, jer u svom sadržaju, osim brojnih bioaktivnih molekula sadrži i specifičnu mikrobnu zajednicu koja je potencijalni izvor probiotičkih sojeva. *Staphylococcus epidermidis* je dio mikrobiote kože zdrave osobe, no prisutnost u mikrobioti majčinog mlijeka se povezuje s laktacijskim mastitisom. Kod *Staphylococcus* spp. koji uzrokuju mastitis, nerijetko je prisutna višestruka rezistencija na antibiotike, što uz mogućnost ovih bakterija da formiraju biofilm na biotičkim površinama, ograničava učinkovitosti antibiotičke terapije. Stoga je cilj ovog rada bio ustanoviti alternativne pristupe primjene probiotičkih bakterija kao strategije za profilaksu i/ili terapiju laktacijskog mastitisa. Istraživanja su provedena s potencijalnim probiotičkim sojevima *Lactiplantibacillus plantarum* iz mikrobiote majčinog mlijeka. Preliminarno je okarakterizirana pojavnost antibiotičke rezistencije kod populacije *Staphylococcus* sojeva te je utvrđena niska učestalost fenotipske rezistencije. Analizirani sojevi *L. plantarum* MB18, KR19 i MC19 iskazuju potencijal inhibicije rasta, ali i inhibicijski učinak na formiranje biofilma *S. epidermidis*. Također, ustanovljeno je da odabrani *L. plantarum* sojevi iz mikrobiote majčinog mlijeka su potencijalni producenti plantaricina koji uz sintetiziranu mliječnu kiselinu, posreduju u antistafilokoknom učinku.

Ključne riječi: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Staphylococcus epidermidis*, mikrobiota majčinog mlijeka, biofilm, plantaricini

Rad sadrži: 42 stranice, 13 slika, 6 tablica, 46 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac, Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasna Novak (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Ana Bielen (član)*
4. prof. dr. sc. Ksenija Markov (zamjenski član)

Datum obrane: 20. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

ANTISTAPHYLOCOCCAL EFFECT OF *Lactiplantibacillus plantarum* STRAINS FROM HUMAN MILK MICROBIOTA

Helena Rak, univ. bacc. ing. biotechn.
0058212535

Abstract: In the context of microbial ecology, human milk is viewed as an ecosystem, because in its content, in addition to numerous bioactive molecules, it also contains specific microbes that are a potential source of probiotic strains. *Staphylococcus epidermidis* is a natural inhabitant of the skin microbiota of a healthy person. However, its presence in the microbiota of human milk is frequently associated with lactational mastitis. *Staphylococcus* spp., the causative agent of mastitis, exert multiple resistance to antibiotics is often present, which, along with the capacity to form a bacterial biofilm, limits the effectiveness of antibiotic therapy. Therefore, the aim of this thesis was to assess alternative approaches to the use of probiotic bacteria as a strategy for the prophylaxis or therapy of lactational mastitis. Research was conducted with potential probiotic strains of *Lactiplantibacillus plantarum* from human milk microbiota. The incidence of antibiotic resistance in the *Staphylococcus* population was preliminarily characterized and a low frequency of phenotypic resistance was determined. Among analyzed strains, *L. plantarum* MB18, KR19 and MC19 inhibited both the growth and biofilm formation of *S. epidermidis*. Also, it was established that selected *L. plantarum* strains from the human milk microbiota are potential plantaricins producers, which mediate antistaphylococcal effect in addition to the synthesized lactic acid.

Keywords: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Staphylococcus epidermidis*, human milk microbiota, biofilm, plantaricins

Thesis contains: 42 pages, 13 figures, 6 tables, 46 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Jasna Novak, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD, Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

Reviewers:

1. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (president)
2. Jasna Novak, PhD, Full professor (mentor)
3. Ana Bielen, PhD, Associate professor (member)
4. Ksenija Markov, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 20th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MAJČINO MLIJEKO KAO POTENCIJALNI IZVOR PROBIOTIKA	2
2.1.1. Sastav mikrobiote majčinog mlijeka	3
2.1.2. Probiotički potencijal BMK iz majčinog mlijeka	4
2.2. ULOGA <i>S. epidermidis</i> U POJAVI MASTITISA KOD DOJILJA	5
2.2.1. Formiranje bakterijskog biofilma kod mastitisa	6
2.3. BAKTERIOCINI KAO FUNKCIONALNE MOLEKULE PROBIOTIČKIH SOJEVA	8
2.3.1. Biosinteza bakteriocina gram-pozitivnih bakterija	9
2.3.2. Mehanizam antimikrobnog djelovanja bakteriocina gram-pozitivnih bakterija ..	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Radni mikroorganizmi	13
3.1.2. Uzorci majčinog mlijeka	13
3.1.3. Hranjive podloge	14
3.1.4. Kemikalije	14
3.1.5. Aparatura i pribor	15
3.2. METODE RADA	17
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	17
3.2.2. Karakterizacija profila antibiotske rezistencije <i>S. epidermidis</i> i <i>S. mitis</i>	17
3.2.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom nacjepljivanja radijalnih crta	17
3.2.4. Inhibicija stvaranja biofilma djelovanjem supernatanta <i>L. plantarum</i>	18
3.2.5. Određivanje antistafilokoknog učinka sojeva mikrobiote majčinog mlijeka.....	20
3.2.6. Određivanje utjecaja temperature i proteolitičkih enzima na antimikrobnu aktivnost odabranih sojeva <i>L. plantarum</i>	21
3.2.7. Statistička analiza podataka	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. <i>S. epidermidis</i> SOJEVI IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA	23
4.2. INHIBICIJA RASTA <i>S. epidermidis</i> I <i>S. mitis</i> SOJEVA	27
4.3. INHIBICIJA FORMIRANJA BIOFILMA <i>Staphylococcus</i> SOJEVA	32
4.2. BAKTERIOCINSKI POTENCIJAL <i>L. plantarum</i>	34
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Osim što osigurava osnovne hranjive tvari za dojenče, majčino mlijeko je izvor prvih bakterija koje koloniziraju gastrointestinalni trakt i dodatno poboljšavaju zdravlje dojenčeta te pomaže u formiranju imunostava (Lyons i sur., 2020). Mikrobiota majčinog mlijeka naseljava se mikrobnom populacijom majčine kože, usta dojenčeta i prijenosom iz majčinog gastrointestinalnog trakta. Najzastupljeniji bakterijski rodovi u majčinom mlijeku su *Staphylococcus* i *Streptococcus*, međutim pronađeni su i mnogi drugi rodovi uključujući *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Bacteroides*. Sastav mikrobiote majčinog mlijeka vrlo je promjenjiv i ovisi o višestrukim čimbenicima, između ostalog, zemljopisnog položaja, načina poroda, okoliša, prehrane majke i sastava mlijeka (Demmelmaier i sur., 2020).

Laktacijski mastitis obično ima infektivno podrijetlo te se glavnim uzročnikom smatra *Staphylococcus aureus*, međutim *Staphylococcus epidermidis* pojavljuje se kao vodeći uzročnik, osobito subakutnog i kroničnog mastitisa. Antibiotička rezistencija i/ili stvaranje biofilma vrlo je česta među kliničkim izolatima ovih dviju vrsta stafilokoka te nije čudno da je veliki udio *Staphylococcus* vrsta koje uzrokuju mastitis otporno na terapiju antibioticima (Jiménez i sur., 2008). Povećana učestalost rezistencije na antibiotike kod uzročnika ključni je uzrok zabrinutosti, što dovodi do potrebe za razvojem novih terapija. U tom su smislu, probiotici i bakteriocini pokazali potencijal kao alternativni tretmani u liječenju mastitisa (Angelopoulou i sur., 2018).

Cilj ovog rada bio je ispitati potencijal antimikrobnog djelovanja *Lactiplantibacillus plantarum* sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema sojevima *S. epidermidis* i *S. mitis* koji su uzročnici subakutnog i kroničnog mastitisa. Preliminarno, kako bi se utvrdila postojanost fenotipske rezistencije *S. epidermidis* na antibiotike, provedena je disk-difuzijska metoda. Nadalje, za ispitivanje inhibicijskog djelovanja *L. plantarum* sojeva iz majčinog mlijeka prema odabranim sojevima, provedena je metoda radijalnih crta, a za ispitivanje inhibicije formiranja biofilma provedena je inkubacija staničnih kultura *S. epidermidis* i *S. mitis* sa supernatantima kulture *L. plantarum* sojeva. Za daljnju karakterizaciju antimikrobne aktivnosti, ispitana je inhibicija rasta *S. epidermidis* metodom rupama u agaru inokulacijom supernatanta tijekom različitih faza rasta odabranih *L. plantarum* sojeva. Obzirom da se antimikrobno djelovanje često objašnjava sintezom specifičnih metabolita, bakteriocina, provedena su i preliminarna ispitivanja moguće inhibicijske aktivnosti bakteriocina podvrgavanjem supernatanta kulture *L. plantarum* sojeva enzimskim i toplinskim tretmanima te je zatim provedena difuzijska metoda s rupama u agaru kako bi se utvrdila inhibicija.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MAJČINO MLIJEKO KAO POTENCIJALNI IZVOR PROBIOTIKA

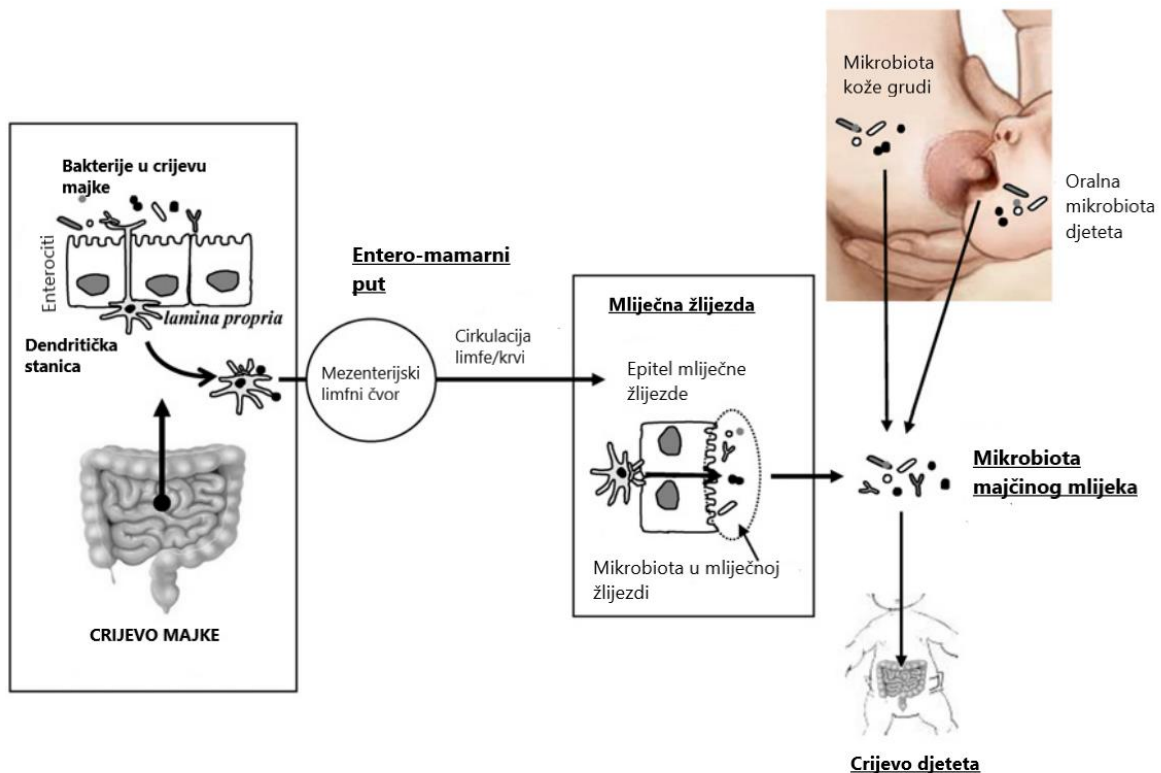
Majčino mlijeko je biološka tekućina kompleksnog sastava prilagođena u svrhu zadovoljenja prehrambenih potreba dojenčeta koje brzo raste. Osim toga, modificira imunosti sustav dojenčeta i osigurava određeni stupanj zaštite od patogena. Ovi učinci odražavaju sinergijsko djelovanje mnogih bioaktivnih molekula prisutnih u kolostrumu i zreom mlijeku, uključujući imunokompetentne stanice, imunoglobuline, masne kiseline, poliamine, oligosaharide, lizozim, laktoferin i druge glikoproteine te antimikrobne peptide koji inhibiraju rast patogena pojedinačno, aditivno i/ili sinergijski (Fernández i sur., 2013). Majčino mlijeko optimalna je hrana za novorođenčad i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) ga preporučuje kao isključivu hranu do najmanje 6 mjeseci starosti. Prva faza laktacije (prvih nekoliko dana postnatalno) osigurava kolostrum, malu količinu imunološki bogate tvari, čija je primarna uloga prijenos imunosti faktora i trofičko pripremanje crijeva dojenčadi (Granger i sur., 2021). Također, mlijeko zdravih žena može se smatrati izvorom potencijalno probiotičkih ili bioterapeutskih bakterija s ulogom u zaštiti majki i/ili dojenčadi od raznih vrsta alergijskih, upalnih ili zaraznih bolesti (Fernández i sur., 2013).

Probiotici se definiraju kao živi mikroorganizmi (bakterije ili kvasci) koji, ako su primjenjeni u adekvatnoj koncentraciji, imaju mnoge povoljne učinke na zdravlje domaćina. Među poznatim probiotičkim mikroorganizmima, bakterije mliječne kiseline (BMK) i bakterije iz roda *Bifidobacterium* imaju dugu povijest sigurne uporabe (de Melo Pereira i sur., 2018). Probiotički mikroorganizmi mogu se izolirati iz niza izvora, a do sad su najčešće izolirani iz mliječnih proizvoda (mlijeko, jogurt, sir itd.), fermentiranog mesa, ribe, žitarica, voća i povrća te kože, gastrointestinalnog trakta ili usne šupljine zdravih životinja i ljudi. Jedan od potencijalnih novih izvora za izolaciju probiotičkih bakterija je i majčino mlijeko (Malik i sur., 2019).

Posljednjih godina, problemi povezani sa širenjem rezistencije na antibiotike među patogenim bakterijama te porast alergijskih i upalnih bolesti u razvijenim zemljama, doveli su do povećanog interesa za probiotike. Posebno su zanimljive probiotičke bakterije koje su izvorno izolirane iz majčinog mlijeka jer ispunjavaju neke od glavnih kriterija koji su općenito važni za izbor probiotika, poput ljudskog podrijetla, povijesti sigurne uporabe kod posebno osjetljive populacije (dojenčad) te prilagodba na sluznicu i mliječne supstrate (Fernández i sur., 2013).

2.1.1. Sastav mikrobiote majčinog mlijeka

Povijesno gledano majčino mlijeko se smatralo gotovo sterilnom tekućinom, međutim ova tvrdnja se pokazala netočnom tijekom godina istraživanja (Gomez-Gallego i sur., 2016). Majčino mlijeko pokazalo se kao izvor niza bakterijskih vrsta, vlastitog jedinstvenog mikrobioma, uključujući korisne, komenzalne i potencijalno probiotičke bakterije (Lyons i sur., 2020). Podrijetlo mikrobiote majčinog mlijeka već je neko vrijeme predmet rasprave. Moguće podrijetlo uključuje bakterije s majčine kože i usne šupljine dojenčeta, gdje je dokazano da tijekom sisanja dolazi do visokog stupnja retrogradnog protoka natrag u žlijezde dojke. U novije vrijeme, istraživanja su pokazala kako je izvor bakterija majčin probavni trakt, pri čemu bakterije prelaze iz crijevne mikrobiote majke do mliječnih žlijezda pomoću dendritičkih stanica koje prodiru u crijevni epitel i prenose bakterije kroz cirkulacijski sustav do mliječnih žlijezda (slika 1). Ovo saznanje je važno zbog mogućnosti manipulacije majčinom mikrobiotom što u konačnici može koristiti za optimiranje mikrobiote majčinog mlijeka (Murphy i sur., 2017).



Slika 1. Potencijalni izvori bakterija prisutnih u majčinom mlijeku (prema Fernández i sur., 2013)

Metagenomskom analizom majčinog mlijeka i sekvencioniranjem ukupne DNA pokazalo se da majčino mlijeko sadrži više od 360 prokariotskih rodova, s *Proteobacteria* i *Firmicutes* kao prevladavajućim koljenima, te *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. i *Streptococcus* spp. kao prevladavajućim rodovima (Ward i sur., 2013). Sastav mikrobiote majčinog mlijeka pod utjecajem je maternalnih faktora te se primjećuje značajna promjena u sastavu u različitim fazama laktacije. Najčešći rodovi u uzorcima kolostruma uključivali su *Leuconostoc*, *Weissella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Lactococcus*. Značajan porast rodova *Veillonella*, *Prevotella* i *Leptotrichia* zabilježena je od prvog do šestog mjeseca nakon poroda. Također, jedni od najistaknutijih rodova tijekom cijelog razdoblja laktacije su *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* te *Bifidobacterium* (Rautava, 2016). Promjene mikrobiote majčinog mlijeka uzrokuju mnogi čimbenici poput dobi, prehrane, zdravstvenog stanja majke, indeksa tjelesne mase, genetike majke te demografskih i okolišnih čimbenika te to sve ima utjecaj na kolonizaciju crijeva, zaštitu od patogena, probavu, metabolizam te neuroendokrini i imunوسي razvoj dojenčeta i zdravlje majke (Fernández i sur., 2020).

2.1.2. Probiotički potencijal BMK iz majčinog mlijeka

Početak 21. stoljeća dokazana je prisutnost BMK u ljudskom mlijeku te je potvrđen njihov probiotički potencijal (Lara-Villoslada i sur., 2007). Probiotički potencijal *Lactobacillus* vrsta izoliranih iz majčinog mlijeka sličan je potencijalu sojeva koji se koriste kao probiotički pripravci u medicini (Łubiech i Twarużek, 2020). Također je pokazano da neke bakterije prisutne u ljudskom mlijeku mogu poboljšati funkciju crijevne barijere povećanjem proizvodnje mucina. Međutim, smatra se da je kompeticija s patogenim bakterijama za hranjive tvari i za vezna mjesta na epitelnim stanicama vjerojatno jedan od glavnih mehanizama probiotičkih bakterija (Lara-Villoslada i sur., 2007). Sojevi *Lactobacillus* vrsta, kao što su *L. gasseri*, *L. fermentum* i *L. salivarius*, izolirani iz mlijeka zdravih majki pokazali su da je njihov probiotički potencijal sličan onom koji pokazuju sojevi koji se u praksi koriste kao komercijalni probiotički proizvodi. Također, komenzalne bakterije izolirane iz majčinog mlijeka istražuju se radi potencijala koji imaju kao bakterioterapijska sredstva za prevenciju infekcija dojki (Jiménez i sur., 2008).

Antimikrobni učinak *Lactobacillus* vrsta prvenstveno je povezan s proizvodnjom organskih kiselina, poput mliječne kiseline, octene kiseline, propionske kiseline te vodikovog peroksida, bakteriocina i antimikrobnih peptida. *Lactobacillus* vrste proizvode organske kiseline heterofermentativnim metaboličkim putem te kiseline stupaju u interakciju sa staničnom

membranom i induciraju unutarstaničnu acidifikaciju i denaturaciju proteina. Antibakterijski učinak mliječne kiseline uzrokovan je fiziološkim i morfološkim promjenama izazvanim u bakterijskoj staničnoj membrani, što uzrokuje istjecanje staničnog sadržaja (Sharma i sur., 2017). Nadalje, bakterije izolirane iz majčinog mlijeka također mogu poboljšati otpornost protiv infekcija indukcijom sazrijevanja citotoksičnih Th1 stanica. Zanimljivo je da *Lactobacillus* u ljudskom mlijeku može pojačati otpuštanje Th1 citokina i TNF- α , te aktivirati NK stanice, CD4+ i CD8+ T-stanice i regulatorne T-stanice. Osim toga, komenzalne bakterije u ljudskom mlijeku, kao što su *Lactobacillus* vrste, imaju sposobnost adhezije na crijevne stanice, što ukazuje na veću mogućnost kolonizacije korisnih bakterija u crijevima dojene djece (Carr i sur., 2021). Također je zabilježen pozitivan učinak *Lactobacillus* vrsta u prevenciji i liječenju mastitisa kod žena te sojevi izolirani iz majčinog mlijeka imaju potencijalnu primjenu u liječenju mastitisa. Nadalje, pokazalo se da oralni unos *Lactobacillus* vrsta izoliranih iz majčinog mlijeka, učinkovito smanjuje mastitis tijekom laktacije uzrokovan *Staphylococcus* vrstama (Łubiech i Twarużek, 2020).

2.2. ULOGA *S. epidermidis* U POJAVI MASTITISA KOD DOJILJA

Mastitis, odnosno upala tkiva dojke, je akutno, devitalizirajuće stanje te potencijalno ozbiljna bolest koja može dovesti čak i do apscesa dojke te septičke groznice. Primarni uzrok mastitisa najčešće je zastoj mlijeka te se javlja kada mlijeko nije pravilno uklonjeno iz kanala dojke. Većina slučajeva mastitisa povezana je s promjenama u mikrobioti mliječnih žlijezda te je tako drugi glavni uzrok nastanka mastitisa infekcija (Angelopoulou i sur., 2018). Mastitis je česta bolest tijekom dojenja te je incidencija pojave mastitisa među dojiljama između 3 i 33 %. Iako se bolest može javiti u bilo kojem trenutku tijekom razdoblja laktacije, između 75 i 95 % slučajeva javlja se unutar prvih 12 tjedana nakon poroda, a učestalost je znatno veća tijekom drugog i trećeg tjedna nakon poroda (Jiménez i sur., 2008).

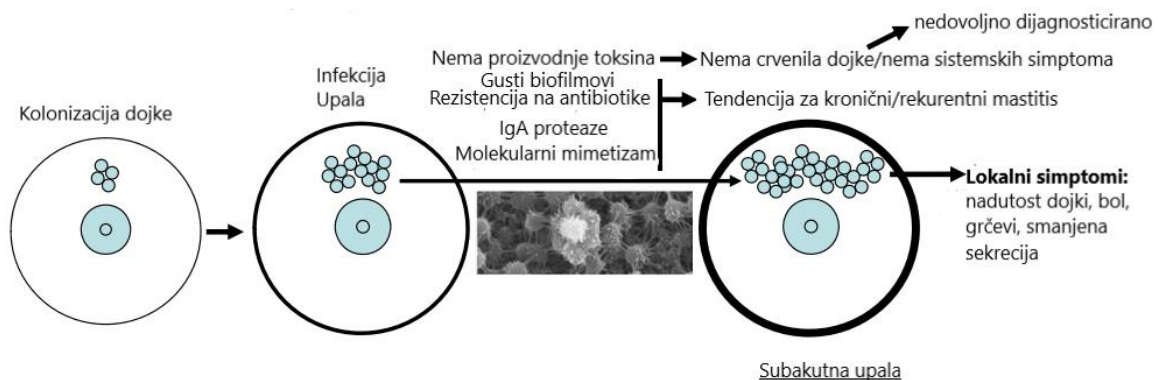
Unatoč tome što su dio komenzalne mikrobiote majčinog mlijeka, *Staphylococcus* i *Streptococcus* vrste često se nalaze u majčinom mlijeku žena koje boluju od mastitisa. Tako se pokazalo da je *S. aureus* često glavni uzročnik akutnog mastitisa, dok se *S. epidermidis* pokazao kao dominantna vrsta odgovorna za subakutni i kronični mastitis. Nekoliko čimbenika može pridonijeti mikrobiološkoj neravnoteži koja pogoduje prekomjernom bakterijskom rastu mikrobiote u mliječnim žlijezdama te u takvim slučajevima disbioze, dolazi do prekomjernog rasta *S. aureus* i *S. epidermidis* (Bergmann i sur., 2014). Majčino mlijeko obično sadrži između 100 i 1000 CFU/ml bakterija, međutim kod pojave mastitisa dolazi do prevladavanja

zastupljenosti jedne ili dvije vrste, a broj bakterija se povećava i do milijun CFU/mL. Simptomi klasičnog, akutnog mastitisa pripisuju se toksinima koji proizvode bakterije, a uključuju bolove tijekom dojenja, crvenilo dojke i povišenu temperatura. U slučajevima subakutnog mastitisa, za čiju pojavu je odgovoran uglavnom *S. epidermidis*, javlja se samo lokalna bol u dojci ili se proizvodi manje mlijeka (Demmelair i sur., 2020).

Neovisno o vrsti, sojevi koji uzrokuju mastitis obično pokazuju dva zajednička svojstva: otpornost na meticilin i druge antibiotike te visoku sposobnost stvaranja biofilma. Ova svojstva objašnjavaju slabu uspješnost liječenja mastitisa antibioticima te razlog zbog kojeg mastitis postaje rekurentna ili kronična infekcija. Zbog toga je posebno privlačan razvoj novih strategija temeljenih na terapiji probiotičkim bakterijama za sprječavanje ili liječenje disbioze kao alternativa ili nadopuna terapiji antibioticima (Jiménez i sur., 2008).

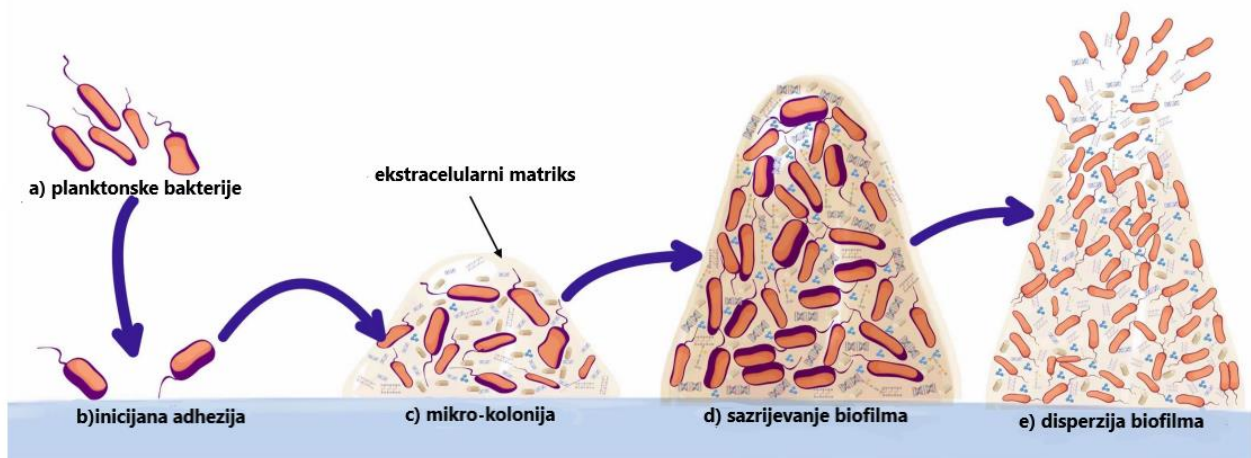
2.2.1. Formiranje bakterijskog biofilma kod mastitisa

Koagulaza-negativni stafilokoki te *S. mitis* i *S. salivarius* prirodni su bakterijski stanovnici ekosustava dojke tijekom dojenja. U fiziološkim uvjetima, ove bakterijske vrste stvaraju tanki sloj biofilma koji oblaže epitel mliječnih kanala, omogućujući neometan protok majčinog mlijeka. Različiti čimbenici mogu pogodovati prekomjernom rastu takvih bakterijskih vrsta, što dovodi do subakutnog ili subkliničkog mastitisa. Budući da koagulaza-negativni stafilokoki te *S. mitis* i *S. salivarius* ne proizvode toksine odgovorne za akutni mastitis, nema sistemskih simptoma i, općenito, lokalni simptomi dojke su blaži, a crvenilo dojke nije prisutno. Međutim, u specifičnim uvjetima, bakterije mogu stvoriti guste biofilme unutar kanalića i upalu epitela dojke, što u konačnici može uzrokovati potpuno ispunjavanje mliječnih kanala formiranim bakterijskim biofilmovima, ometajući ili blokirajući protok mlijeka i dovodeći do nadutosti dojke (slika 2) (Rodríguez i Fernández, 2017).



Slika 2. Shematski prikaz etiopatogeneze subakutnog mastitisa (prema Rodríguez i Fernández, 2017)

S. epidermidis obično je bezopasna komenzalna bakterija koja je značajno zastupljena u mikrobioti čovjeka. Međutim, u određenim uvjetima, *S. epidermidis* može prijeći iz kolonizacijske u invazivnu aktivnost. *S. epidermidis* ima svojstva oportunističkog patogena jer ima sposobnost formiranja biofilma (Büttner i sur., 2015). Među mnogim vrstama infekcija koje mogu biti uzrokovane stafilokoknim vrstama, one povezane s biofilmom najteže je liječiti zbog povećane otpornosti stafilokoka na imunski odgovor domaćina te na liječenje antibioticima. Nakon početnog stvaranja biofilma, imunski sustav domaćina aktivira signalne mehanizme obrane od bakterija, što dovodi do oštećenja tkiva domaćina koje dodatno pogoduje razvoju biofilma (Schilcher i Horswill, 2020). Uobičajeno, proces stvaranja biofilma može se podijeliti na najmanje tri koraka. Tijekom faze inicijalne adhezije, bakterije prijanjaju na površinu koju koloniziraju, dok tijekom faze sazrijevanja, bakterije uspostavljaju trodimenzionalnu, višestaničnu i višeslojnu strukturu u kojoj većina bakterija nema izravan kontakt s površinom (slika 3). *S. epidermidis*, dakle, može ponovno osloboditi stanice iz biofilma, a vjeruje se da upravo te oslobođene stanice omogućuju bakteriji *S. epidermidis* da stvori novi biofilm (Büttner i sur., 2015).



A) Planktonske bakterije se nasumično kreću. B) Planktonske bakterije prijanjaju na površinu. C) Stvaranje mikro-kolonija. D) Razvoj zrelog biofilma. E) Biofilm se raspada, a bakterije se ponovno slobodno i nasumično kreću

Slika 3. Od planktonskog rasta bakterija prema formiranju biofilma (prema Ma i sur., 2022)

Utvrđeno je da je većina slučajeva mastitisa povezana s promjenama sastava mikrobne populacije mikrobiote mliječne žlijezde i da većina bakterija koje uzrokuju mastitis imaju sposobnost stvaranja biofilma u mliječnim kanalima koji su prilično uski. To na koncu dovodi do poremećaja protoka mlijeka i zadržavanja mlijeka u mliječnim žlijezdama te posljedično do pojave mastitisa. Također je poznato da je 25 % majki koje prekinu dojenje zbog mastitisa u jednom trenutku već primalo terapiju antibioticima 2-4 tjedna, međutim s niskom razinom učinkovitosti terapije (Angelopoulou i sur., 2018).

Probiotičke bakterije se uspješno koriste za suzbijanje rasta stafilokoka kod ljudi na površinama sluznica. Nasuprot tome, suzbijanje već formiranih stafilokoknih biofilmova još uvijek je na eksperimentalnoj razini. Budući da se terapija u stvarnom kliničkom scenariju obično mora baviti već postojećim biofilmovima, učinak na smanjenje već postojećeg biofilma bio bi iznimno vrijedan. Alternativno, inhibicijski učinak na rast i stvaranje novih biofilmova mogao bi igrati važnu ulogu za sprječavanje nastanka biofilma. Iz tog razloga, probiotičke bakterije, ili antimikrobne tvari koje one izlučuju, mogu se koristiti i u preventivne i u terapijske svrhe (Frickmann i sur., 2018).

2.3. BAKTERIOCINI KAO FUNKCIONALNE MOLEKULE PROBIOTIČKIH SOJEVA

Otkriće antibiotika predstavlja jedno od najvećih postignuća u medicini i liječenju zaraznih bolesti te je uvelike poboljšalo kvalitetu života i produžilo životni vijek diljem svijeta. Međutim, antibiotska rezistencija pojavila se već nekoliko godina nakon početka uporabe antibiotika te njeno kontinuirano širenje predstavlja veliki zdravstveni problem. Multirezistencija, pa čak i pan-rezistencija na glavne klase antibiotika koji se obično koriste u kliničkoj praksi sve se više primjećuje, kako za gram-pozitivne bakterije, tako i za gram-negativne bakterije. Međutim, u utrci protiv antibiotske rezistencije vrlo je važan razvoj novih antibiotika te drugih antimikrobnih spojeva (Simons i sur., 2020). Kako bi se došlo do novih potencijalnih antimikrobnih spojeva, istraženi su brojni prirodni resursi, uključujući biljke, životinje i brojne mikroorganizme. Na taj su način iz bakterija koje posjeduju antagonističku aktivnost izolirani bakteriocini, koji su pokazali mnoga obećavajuća antimikrobna svojstva protiv različitih bakterijskih, fungalnih i virusnih vrsta te prirodno rezistentnih struktura poput bakterijskih biofilmova, zbog čega se smatraju mogućom alternativom antibioticima u liječenju bolesti uzrokovanih bakterijama rezistentnim na antibiotike (Hassan i sur., 2012).

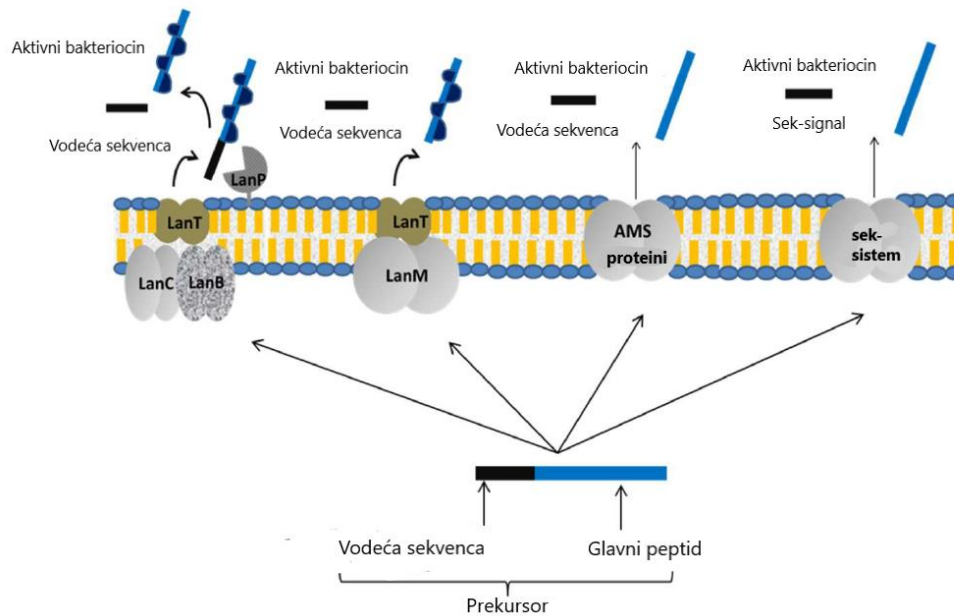
Svojstvo da živi organizmi proizvode antagonističke spojeve očuvana je karakteristika tijekom evolucije. Bakteriocini su ribosomski proizvedeni antimikrobni peptidi iz bakterija, koji mogu, a i ne moraju biti modificirani posttranslacijskim modifikacijama te se transportiraju u izvanstanični medij. Bakteriocini koje proizvode BMK su posebno zanimljivi zbog duge povijesti sigurne uporabe i probiotičkih svojstava mnogo sojeva iz skupine BMK (Alvarez-Sieiro i sur., 2016). Poželjno svojstvo probiotičkog soja je i sposobnost da proizvodi antimikrobne tvari, baš kao što su bakteriocini koji nude potencijal za ostvarivanje prednosti u konkurenciji za hranjive tvari i kolonizaciji gastrointestinalnog trakta. Poznati su bakteriocini koje proizvode gram-pozitivne bakterije i bakteriocini koje proizvode gram-negativne bakterije. Bakteriocini koje proizvode gram-pozitivne bakterije mogu se podijeliti u četiri razreda. Klasa I su lantibiotici i glavni predstavnik ove skupine je nizin. Klasa I predstavlja termostabilne peptide vrlo male molekulske mase (<5 kDa) te ju karakterizira prisutnost lantionina i njegovih derivata u strukturi bakteriocina. Klasa II obuhvaća male termostabilne peptide (<10 kDa) podijeljene u tri podklase: IIa (pediocin i enterocin), IIb (laktocin G) i IIc (laktocin B). Klasu III predstavljaju termolabilni peptidi velike molekulske mase (>30 kDa) kao što su helveticin J, dok klasa IV sadrži velike peptide u kompleksu s ugljikohidratima ili lipidima (Balciunas i sur., 2013).

Smatra se da *L. plantarum* proizvodi najmanje 6 različitih bakteriocina koji generalno pripadaju klasi II. Plantaricini inhibiraju širok raspon bakterija, uključujući njihove prirodne konkurente *L. plantarum* vrsta i druge bakterije poput *Pediococcus*, *Carnobacteria*, *Clostridia* i *Propionibacterium*. Plantaricini JK, EF djeluju kao sinergijski peptidi i dugi su 30 odnosno 40 aminokiselinskih ostataka. Djeluju sa strogom specifičnošću i bilo koja druga kombinacija, osim JK i EF, dovodi do potpunog gubitka sinergije. Plantaricin S je dvopeptidni sustav izoliran iz sojeva *L. plantarum* te peptidi koji izgrađuju plantaricin sadrže 26 i 27 aminokiselinskih ostataka. Još jedan dvopeptidni bakteriocin je plantaricin W koji se sastoji od proteinskih molekula Plwa i Plwb. Ove komponente bakteriocina sastoje se od 29 i 32 aminokiselinska ostatka (Zacharof i Lovitt, 2012).

2.3.1. Biosinteza bakteriocina gram-pozitivnih bakterija

Kemijske i trodimenzionalne strukture bakteriocina, kao i njihovi biosintetski putevi mogu biti vrlo različiti. Genetske determinante za proizvodnju bakteriocina u gram-pozitivnim bakterijama mogu se sastojati od samo dva ili čak 21 gena. Nadalje, neki bakterijski sojevi mogu proizvesti i više od jednog bakteriocina. Većina bakteriocina, s izuzetkom određenih

klasa kao što su botromicini i bakteriocini bez vodećih sekvenci, proizvode se kao prekursori s N-terminalnim vodećim peptidom koji se uklanja proteazom kako bi se dobio zreli bakteriocin. Biološka aktivnost prekursora znatno je niža od one zrelog bakteriocina (Acedo i sur., 2018).



Slika 4. Stanični mehanizmi prijenosa bakteriocina preko stanične ovojnice gram-pozitivnih bakterija (prema Simons i sur., 2020)

Nekoliko gena uključeno je u proizvodnju klase I bakteriocina gram-pozitivnih bakterija (npr. nizina) i općenito se u genomu pojavljuju kao klasteri koji sadrže strukturne, regulatorne, modifikacijske, transportne gene te gene autoimuniteta. Što se tiče bakteriocina klase II, nikakvi specijalizirani posttranslacijski geni nisu uključeni u biosintetski put, a sazrijevanje se općenito događa istodobno s transportom (slika 4). Kod nekih bakteriocina, na ribosomima se najprije sintetizira prepeptid sastavljen od N-terminalnog vodećeg peptida i C-terminalnog prepeptida. Pokazalo se da vodeći peptid igra ključnu ulogu u sazrijevanju bakteriocina klase I. Neki bakteriocini klase II sadrže sek-ovisan N-terminalni vodeći peptid koji je neophodan za njihov transport putem sekretornog sek-puta (slika 4). U drugim slučajevima, transport formiranog prepeptida i cijepanje vodećeg peptida odvija se pomoću jednog proteolitičkog enzima koji pripada obitelji ABC transportera. Podklase bakteriocina IIa i IIb mogu koristiti specijalizirane proteine sazrijevanja i sekrecije ABC transportera (AMS) koji mogu istodobno transportirati i cijepati vodeći peptid (slika 4) (Simons i sur., 2020).

Mnoga su istraživanja pokazala da je sinteza bakteriocina regulirana mehanizmom *quorum sensing*. U ovom regulatornom sustavu, bakterije spontano sintetiziraju i otpuštaju signalnu molekulu, takozvani autoinduktor, te osjećaju promjene u koncentraciji autoinduktora i shodno tome reguliraju odgovor drugih bakterija. Pomoću ovog sustava bakterijske stanice razmjenjuju informacije te je poznato da je ekstracelularna koncentracija autoinduktora u pozitivnoj korelaciji s gustoćom stanica. Kada se postigne određena koncentracija, pokreće se ekspresija povezanih gena kako bi se stanice prilagodile na promjene u okolini. *Quorum sensing* je opisan kao sustav koji modulira proizvodnju bakteriocina *L. plantarum* sojeva. U slučaju *L. plantarum*, PlnA je autoinduktor koji sadrži vodeći peptid kojeg prepoznaje PlnB, specifična histidin protein kinaza smještena na staničnoj membrani. Kada ekstracelularna koncentracija PlnA dosegne određenu koncentraciju dolazi do fosforilacije i aktivacije specifične protein kinaze. Fosfatna skupina se prenosi na regulator, PlnC/PlnD, u citoplazmi putem autofosforilacije, koja pokreće transkripciju i ekspresiju srodnih gena. Specifična protein kinaza i regulator čine dvokomponentni sustav koji je odgovoran za prijenos signala koji inducira sintezu bakteriocina (Wu i sur., 2021).

2.3.2. Mehanizam antimikrobnog djelovanja bakteriocina gram-pozitivnih bakterija

Većina antimikrobnih peptida su kationski i hidrofobni, a njihov antimikrobni učinak uglavnom je posljedica membranskih permeabilizacija. Općenito se pretpostavlja da elektrostatsko privlačenje među bakteriocinima i negativno nabijenim fosfolipidima olakšava početnu interakciju peptida s površinom stanice, dok njihova hidrofobna svojstva omogućuju integraciju u membranu (Sand i sur., 2013). Antimikrobno djelovanje bakteriocina gram-pozitivnih bakterija obično je povezano s disrupcijom bakterijske membrane, što dovodi do stanične smrti. Među različitim mogućim mehanizmima, ovaj učinak može biti rezultat izravne interakcije s komponentom lipida II bakterijske membrane, manoznim fosfo-transferaznim sustavom ili bez uključivanja specifičnog receptora. Nizin djeluje stvaranjem pora koristeći lipid II, što dovodi do povećanja propusnosti membrane ciljane stanice te to dovodi do njezine smrti. Slični mehanizmi zabilježeni su i za druge bakteriocine gram-pozitivnih bakterija podklase Ia kao što su epidermin i galidermin. Drugi bakteriocini imaju antimikrobni učinak temeljen na enzimskoj inhibiciji biosinteze peptidoglikana, što dovodi do citoplazmatske akumulacije prekursora peptidoglikana i posljedično disrupcije bakterijske membrane. Razni bakteriocini klase II (npr. pediocin, sakacin, laktokokin A) ciljaju manozni fosfo-transferazni sustav, transportni sustav koji se koristi za povezivanje transporta šećera u stanicu te njihovu

fosforilaciju. Enzim EII prisutan u ovom sustavu sastoji se od tri proteina te predstavlja metu ove vrste bakteriocina. Interakcija bakteriocina s manoznim fosfo-transferaznim sustavom dovodi do konstantnog otvaranja ovog receptora, a time do nekontroliranog i kontinuiranog istjecanja intracelularnog medija. Bakteriocini podklase IIb, kao što su dvopeptidni bakteriocini, također djeluju stvaranjem pora u membrani, vjerojatno interakcijom s membranskim proteinima (Simons i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu su korištene vrste *Lactiplantibacillus plantarum*, *Staphylococcus epidermidis* i *Streptococcus mitis* prikazane u tablici 1. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

Tablica 1. Bakterijski sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura koji su korišteni u ovom radu

Naziv i oznaka soja	Izvor
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> KR19	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> MC19	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RS10	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> MB7	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> MB15	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> MB18	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Staphylococcus epidermidis</i> MC5	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Staphylococcus epidermidis</i> AF2	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Staphylococcus epidermidis</i> AF4	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Staphylococcus epidermidis</i> MB6	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RS8	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RS17	Mikrobiota majčinog mlijeka
<i>Streptococcus mitis</i> RS19	Mikrobiota majčinog mlijeka

3.1.2. Uzorci majčinog mlijeka

Uzorke mlijeka su prikupljale majke (n=5), dobrovoljne sudionice istraživanja, unutar 7 dana nakon poroda, mjesec dana nakon poroda i mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu djeteta. Uzorci mlijeka su prikupljeni prije samog dojenja izdajanjem manualnom ekspresijom u sterilne posudice, pri čemu je prvih nekoliko kapljica mlijeka odbačeno. Za prikupljanje i rad s navedenim uzorcima, dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva (Br. 380-

59-10106-17-100/99, Klasa 641-01/17-02/01) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su smrznuti odmah nakon prikupljanja i transportirani u Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i pohranjeni na -80 °C do daljnjih analiza (Banić, 2021).

3.1.3. Hranjive podloge

a) U ovom radu za uzgoj i održavanje BMK korištene su

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

b) Za uzgoj i održavanje *S. epidermidis* i *S. mitis* korištene su

- BHI (Brain Heart Infusion) agar, sastava (g/L destilirane vode) infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta
- BHI bujon je istog sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.

3.1.4. Kemikalije

- Anaerokult „Merck“, Njemačka
- Antibiotici „Becton, Dickinson and Company“, SAD
- Antibiotici „Oxoid“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Etanol 96 % „Kemika“, Hrvatska
- Fenolftalein „Kemika“, Hrvatska
- Glicerol „Alkaloid“, Makedonija
- Kristal violet „Merck“, Njemačka
- Natrijev hidroksid „Kemika“, Hrvatska
- Pankreatin „AppliChem“, Njemačka
- Pepsin „AppliChem“, Njemačka
- Proteinaza K „Invitrogen“, SAD

3.1.4.1. Antibiotici

Za ispitivanje osjetljivosti sojeva *S. epidermidis* i *S. mitis* na antibiotike disk-difuzijskom metodom koristili su se filter diskovi promjera 6 mm s poznatom koncentracijom određenog antibiotika. U radu su korišteni antibiotici prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Antibiotici korišteni u radu za ispitivanje osjetljivosti disk-difuzijskom metodom

Naziv antibiotika	Oznaka	Koncentracija
Tetraciklin	Te 30	30 µg
Ampicilin	Am 10	10 µg
Streptomycin	S 10	10 µg
Kloramfenikol	C 30	30 µg
Kanamycin	K 30	30 µg
Eritromicin	E 15	15 µg
Klindamicin	CC 2	2 µg
Klaritromicin	CLR 5	5 µg
Gentamicin	CN 10	10 µg
Vankomicin	VA 30	30 µg
Azitromicin	AZM 15	15 µg
Fosfomicin	FOS 50	50 µg
Sptiramicin	SP 100	100 µg

3.1.5. Aparatura i pribor

- Analitička vaga, „Scaltec”, Njemačka
- Autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- Automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Centrifuga Centric 160, „Tehtnica“, Slovenija
- Centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- Čitač mikrotitarskih pločica Infinite F Plex, „Tecan”, Švicarska
- Eppendorf kivete, „Eppendorf“, SAD
- Epruvete, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmayer tikvice, “Gram-mol”, Hrvatska
- Filter za injekcijsku špricu Qpore PES 0,22 µm „NeoLab“, Njemačka
- Hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- Igle za injekcijske šprice, „Berpu Medical Technology“, Kina
- Injekcijske šprice, „Becton Dickinson“, Španjolska
- Kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml

- Mikrobiološka ušica, „Syntesys“, Italija
- Mikrotitratske pločice (96 jažica), „Falcon“, Engleska
- Nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Parafilm „BemisTM“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH metar, „Metrohm“, Švicarska
- Pinceta, „Isolab“, Njemačka
- Termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- Vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- Vodena kupelj „Inkolab“, Hrvatska
- Zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, Njemačka

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Svi sojevi korišteni u ovom radu čuvani su pri -80 °C u tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % v/v glicerola. Sojevi su 24 sata prije provođenja eksperimenta inokulirani u optimalni hranjivi medij (MRS ili BHI bujon) i inkubirani pri 37 °C. Sojevi *L. plantarum* inkubirani su u anaerobnim uvjetima, a sojevi *S. epidermidis* i *S. mitis* inkubirani su u aerobnim uvjetima.

3.2.2. Karakterizacija profila antibiotičke rezistencije *S. epidermidis* i *S. mitis*

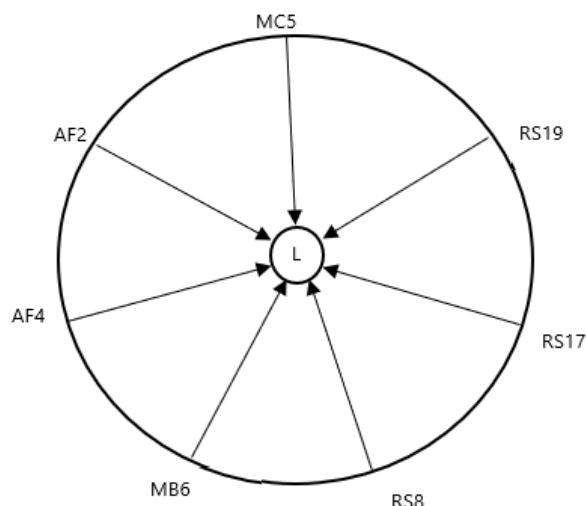
Određivanje profila antibiotičke rezistencije provedeno je na krutim hranjivim podlogama disk-difuzijskom metodom. U 12 ml BHI agara, koji je prethodno otopljen i ohlađen u vodenoj kupelji na 55 °C, inokulirano je 250 µL prekonoćne kulture *S. epidermidis* i *S. mitis* sojeva. Nakon skrutnjavanja hranjive podloge sterilnom pincetom su naneseni filter-diskovi antibiotika. Ploče su inkubirane 24 h na 37 °C te je zatim izmjeren promjer zona inhibicije rasta, uključujući i promjer antibiotičkog diska.

3.2.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom nacjepljivanja radijalnih crta

Antimikrobna aktivnost metodom nacjepljivanja radijalnih crta određena je prema Coman i sur. (2014) uz modifikacije. Na pripremljene ploče sa 12 mL MRS agara inokulirano je po 20 µL prekonoćne kulture *L. plantarum* kako je prikazano na slici 5 te su ploče inkubirane 24 h u anaerobnim uvjetima pri 37 °C. Zatim su mikrobiološkom ušicom nacijepljeni sojevi *S. epidermidis* i *S. mitis* kako je prikazano na slici 5 te su ploče inkubirane dodatnih 24 h u aerobnim uvjetima pri 37 °C. Antimikrobna aktivnost je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$IA = \frac{PZI - PZR}{2}$$

gdje je IA inhibicijska aktivnost (mm), PZI promjer zone inhibicije (mm), a PZR promjer zone rasta *L. plantarum* (mm).



L = rast *L. plantarum*; MC5-RS19 = linije *S. epidermidis* sojeva i soja *S. mitis*

Slika 5. Shematski prikaz metode nacjepljivanja radijalnih crta

3.2.4. Inhibicija stvaranja biofilma djelovanjem supernatanta *L. plantarum*

Inhibicija stvaranja biofilma djelovanjem supernatanta *L. plantarum* bez stanica ispitana je prema Esteban i sur. (2010) s određenim modifikacijama. Nakon prekonoćnog uzgoja bakterijskih stanica sojeva *S. epidermidis* i soja *S. mitis* broj živih bakterija određen je indirektnom metodom, odnosno nacjepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u sterilnoj destiliranoj vodi na BHI agar u obliku kapi (10 μ L) u dvije paralele. Nakon inkubacije 24 h u aerobnim uvjetima pri 37 °C porasle kolonije su izbrojene te je izračunat broj živih stanica (*engl. Colony-forming units, CFU*) po mililitru uzorka prije formiranja biofilma. Na mikrotitarsku ploču je najprije inokulirano 100 μ L prekonoćnih kultura sojeva *S. epidermidis* i *S. mitis*. Zatim je 5 mL prekonoćnih kultura *L. plantarum* centrifugirano 5 min pri 4200 o/min. Supernatant je zatim profiltriran kroz filter veličine pora 0,22 μ m. 100 μ L profiltriranog supernatanta (supernatant bez stanica) inokulirano je u mikrotitarske ploče zajedno sa suspenzijama prekonoćnih kultura *S. epidermidis* i *S. mitis*. Za svaki soj *S. epidermidis* i *S. mitis* potrebno je napraviti slijepu probu koja sadrži samo medij uzgoja te po jednu probu za svaki soj bez dodatka supernatanta bez stanica. Mikrotitarske ploče su zatim inkubirane 24 h u aerobnim uvjetima pri 37 °C. Nakon inkubacije, najprije je uklonjen medij iz jažica koje su zatim 3 puta isprane PBS-om. U jažice je zatim dodano 100 μ L kristal violeta koji je zatim inkubiran 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije kristal violet je uklonjen iz jažica koje su zatim 5 puta isprane sterilnom destiliranom vodom. Nakon ispiranja u jažice je dodano 200 μ L 96 %-tnog etanola te je provedena inkubacija 10 min na sobnoj temperaturi. Zatim je uzeto 100 μ L obojenog etanola koji je prenesen u novu mikrotitarsku

ploču, nakon čega je izmjeren OD pri 540 nm. Izmjereni OD₅₄₀ uzorka uspoređen je sa srednjom vrijednosti OD₅₄₀ svih negativnih kontrola te je određena značajnost stvaranja biofilma prema tablici 3. U tablici 4 prikazani su rezultati određivanja koncentracije stanica prije formiranja biofilma te je pokazano da je koncentracija stanica prije formiranja biofilma približno jednaka (isti red veličine).

Tablica 3. Kvalitativna kategorizacija svojstva formiranja biofilma utemeljena na rezultatima istraživanja

(OD₅₄₀ uzorka – OD₅₄₀ negativne kontrole) > 0	*	slabo formiranje biofilma
(OD₅₄₀ uzorka – OD₅₄₀ negativne kontrole) > OD₅₄₀ negativne kontrole	**	umjereno formiranje biofilma
(OD₅₄₀ uzorka – OD₅₄₀ negativne kontrole) > 2 x OD₅₄₀ negativne kontrole	***	izraženo formiranje biofilma
(OD₅₄₀ uzorka – OD₅₄₀ negativne kontrole) > 3 x OD₅₄₀ negativne kontrole	****	vrlo izraženo formiranje biofilma

Tablica 4. Koncentracija stanica po mL prije formiranja biofilma

SOJ	CFU/ml
MC5	8,15*10 ⁸
AF2	1,6*10 ⁸
AF4	2*10 ⁸
MB6	1,4*10 ⁸
RS8	2,2*10 ⁸
RS17	2,1*10 ⁸
RS19	2,4*10 ⁸

3.2.5. Određivanje antistafilokoknog učinka sojeva mikrobiote majčinog mlijeka

Nakon prekonocnog uzgoja odabranih *L. plantarum* sojeva, MRS bujon je inokuliran s 1 % inokuluma prekonocne kulture, odnosno dodano je 1,5 ml inokuluma u 150 ml MRS bujona. Za praćenje staničnog rasta, acidifikacije i antimikrobne aktivnosti uzimani su uzorci u određenim vremenskim intervalima (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h i 48 h).

3.2.5.1. Praćenje staničnog rasta i acidifikacije medija

Za praćenje staničnog rasta, 200 µL suspenzije je inokulirano u mikrotitarsku ploču te je izmjeren OD pri 620 nm. Za slijepu probu je u mikrotitarsku ploču inokulirano 200 µL MRS hranjivog bujona. Postupak je ponovljen za svaki vremenski interval. Praćenje acidifikacije provedeno je mjerenjem pH i % mliječne kiseline u određenim vremenskim intervalima. Za mjerenje pH i % mliječne kiseline centrifugirano je 5 mL suspenzije 10 min na 4200 o/min. U supernatantu kulture, dobivenom centrifugiranjem, pomoću pH metra određena je pH vrijednost. Za određivanje postotka sintetizirane mliječne kiseline 1 ml supernatanta kulture je razrijeđen s 19 ml destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 ml. Razrijeđeni uzorak je titriran s 0,1 M NaOH uz dodatak fenolftaleina kao indikatora, do pojave blijedo ružičaste boje. Broj mililitara 0,1 M NaOH utrošenih za neutralizaciju, pomnožen s dva predstavlja kiselost u stupnjevima Soxhlet-Henkela (°SH). Postotak proizvedene mliječne kiseline izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 20 \times f_{\text{NaOH}} \times 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^{\circ}\text{SH} \times 0,0225$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$$

$$f_{\text{NaOH}} = 1$$

$$(1^{\circ}\text{SH} \sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline } (\%))$$

3.2.5.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti metodom difuzije s rupama u agaru

Antimikrobna aktivnost supernatanta odabranih sojeva *L. plantarum* ispitana je metodom difuzije s rupama u agaru. Najprije je 5 mL suspenzije stanica centrifugirano 10 min na 4200 o/m. Supernatant je potom filtriran kroz filter promjera 0,22 µm. Dobiveni supernatanti iz svakog vremenskog intervala korišteni su za određivanje antimikrobne aktivnosti. Zatim je 250 µL prekonocnih bakterijskih kultura odabranih sojeva *S. epidermidis* naciepljeno u 12 mL BHI agara koji je prethodno otopljen i temperiran u vodenoj kupelji na 55 °C. Tako inokulirane

podloge su zatim izlivena u Petrijeve zdjelice. Nakon što su se hranjive podloge skrutnule, sterilnim bušačem promjera 8 mm izbušene su „rupe“ u agaru te su sterilnom mikrobiološkom ušicom uklonjeni agarni diskovi. U dobivene „rupe“ dodano je 50 µL pripremljenog supernatanta bez stanica. Nakon toga ploče su inkubirane 24 h u aerobnim uvjetima pri 37 °C, nakon čega su izmjerene zone inhibicije za svaki od vremenskih intervala.

3.2.6. Određivanje utjecaja temperature i proteolitičkih enzima na antimikrobnu aktivnost odabranih sojeva *L. plantarum*

Nakon prekonoćnog uzgoja odabranih sojeva *L. plantarum*, 10 mL suspenzije je centrifugirano 5 min pri 4200 o/min. Zatim je supernatant profiltriran kroz filter veličine pora 0,22 µm. Supernatant je zatim razdjeljen u 6 različitih Eppendorf kiveta te je svaki od supernatanta podvrgnut različitim tretmanima. Supernatanti su tretirani s 1 mg/mL proteinaze K tijekom 2 h pri 37 °C, zatim s 1 mg/mL pepsina i pankreatina, zagrijavanjem na 100 °C tijekom 30 min te je jedan uzorak supernatanta ostao netretiran kao kontrola. Zatim je 100 µL odabranih sojeva *S. epidermidis* nacijepljeno u 12 mL BHI agara koji je prethodno otopljen i temperiran u vodenoj kupelji na 55 °C te je podloga zatim izlivena u Petrijevu zdjelicu. Kad se podloga skrutnula, bušačem promjera 8 mm su izbušene „rupe“ te je u njih dodano po 50 µL različitih uzoraka supernatanta. Petrijeve zdjelice su zatim inkubirane 24 h u aerobnim uvjetima na 37 °C. Nakon inkubacije izmjerene su zone inhibicije te su promjeri zona inhibicije tretiranog supernatanta uspoređeni s promjerom zone inhibicije netretiranog supernatanta.

3.2.7. Statistička analiza podataka

Eksperimenti su ponovljeni tri puta te su određene srednje vrijednosti i standardne devijacije. Statistički značajne razlike uzoraka određene su jednosmjernom analizom varijance (engl. one-way analysis of variance, one-way ANOVA), primjenom Statistics Kingdom računalnog programa (<https://www.statskingdom.com/180Anova1way.html>). Statistička razlika između uzoraka se smatrala značajnom ukoliko su p vrijednosti bile manje od 0,05.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivan je antistafilokokni učinak BMK vrste *L. plantarum* izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka. U žarištu istraživanja je antimikrobno djelovanje prema bakterijskim sojevima iz roda *S. epidermidis*, koji su učestali uzročnik laktacijskog mastitisa. Temeljem rezultata doktorskog rada, određen je udio bakterijske vrste *S. epidermidis* u različitim fazama dojenja zdravih majki (Banić, 2021). *S. epidermidis* je dio mikrobiote kože i sluznica kod zdravih osoba i njegova rasprostranjenost u različitim ekosustavima kao komenzalne vrste otežava razlučivanje o intervenciji terapijskim pristupima. Osobito je važan oprez zbog rasprostranjenosti antibiotske rezistencije među sojevima koji uzrokuju mastitis. Stoga je provedena analiza profila antibiotske osjetljivosti sojeva *S. epidermidis* kako bi se ispitala postojanost fenotipske rezistencije izolata. Probiotički sojevi iz majčinog mlijeka imaju potencijalnu primjenu za profilaksu i čak terapiju mastitisa uzrokovanog *S. epidermidis* sojevima. Stoga je sljedeće provedena analiza antimikrobnog djelovanja *L. plantarum* vrsta izoliranih iz majčinog mlijeka metodom radijalnih crta. Analizom rezultata, sojevi *L. plantarum* koji su pokazali statistički najznačajniju inhibiciju, odabrani su za daljnju analizu inhibicijskog djelovanja. Praćen je rast odabranih sojeva *L. plantarum* MB18, *L. plantarum* KR19 i *L. plantarum* MC19 u MRS mediju tijekom perioda od 48 h te su određivani parametri rasta, poput postotka proizvedene mliječne kiseline, pH i OD₆₂₀ koji je proporcionalan koncentraciji stanica u mediju. Također, u određenim vremenskim intervalima od 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 i 48 h, određivana je antimikrobna aktivnost supernatanta bez stanica odabranih sojeva *L. plantarum* prema odabranim sojevima *S. epidermidis*. Bakterija *S. epidermidis* ima mogućnost stvaranja biofilma te time znatno otežava liječenje mastitisa antibioticima. Stoga je provedena analiza inhibicijskih učinaka supernatanta kulture odabranih *L. plantarum* sojeva na formaciju biofilma *S. epidermidis* i *S. mitis* sojeva. Pojedini sojevi koji pripadaju vrsti *L. plantarum* proizvode antimikrobne peptide tzv. plantaricine. Kako bi se dokazalo da antimikrobna aktivnost supernatanta nije rezultat samo sinteze mliječne kiseline koju proizvodi *L. plantarum*, već kod producenata, antimikrobna aktivnost proizlazi iz plantaricina, supernatanti bez stanica su tretirani visokom temperaturom i proteolitičkim enzimima (pepsinom, pankreatinom i proteinazom K).

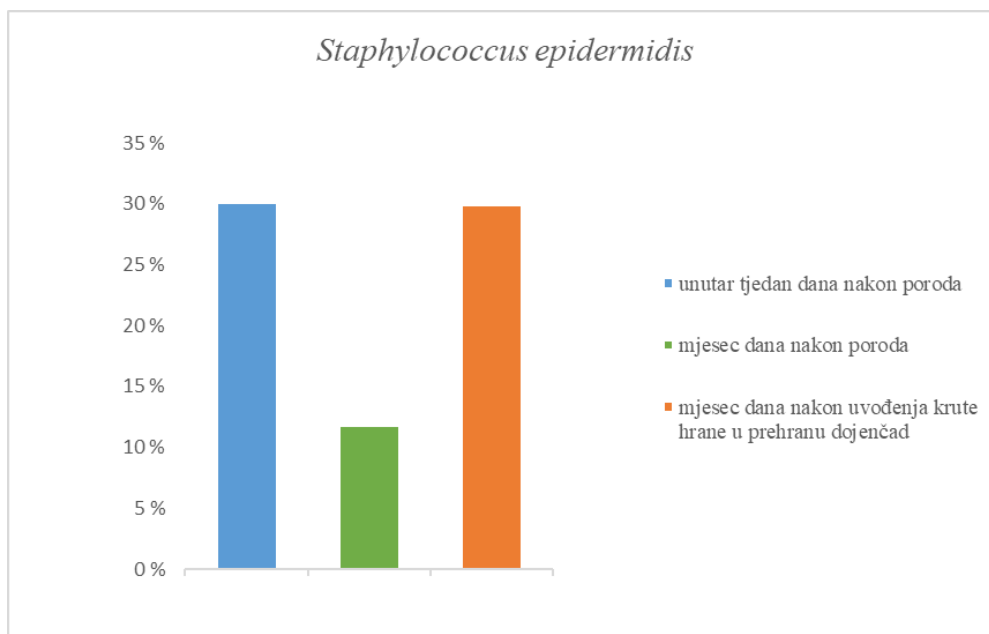
4.1. *S. epidermidis* SOJEVI IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

Sastav hranjivih tvari i bioaktivnih spojeva majčinog mlijeka promjenjiv je tijekom laktacije u skladu s nutritivnim zahtjevima dojenčeta u razvoju. Veća mikrobna raznolikost otkrivena u ranoj fazi laktacije mogla bi biti posljedica veće prisutnosti hranjivih tvari kao što su proteini i bioaktivnih tvari kao što su imunoglobulini, citokini i oligosaharidi u kolostrumu i ranom mlijeku (Lyons i sur., 2022). Gonzalez i sur. (2021) istraživali su mikrobiotu majčinog mlijeka tijekom dva vremenska perioda kod različitih dojilja i to 6-46 dana nakon poroda i 109-184 dana nakon poroda. Uočena je promjena u sastavu mikrobiote majčinog mlijeka, uz prisustvo *Staphylococcus* i *Streptococcus* rodova u većim koncentracijama u ranoj fazi laktacije i *Sphingobium* i *Pseudomonas* u zreлом mlijeku. Lyons i sur. (2022) pokazali su da se brojnost nekoliko koljena značajno razlikovala sa stupnjem laktacije. Zastupljenost bakterija iz koljena *Firmicutes* značajno je povećana tijekom vremena dok se zastupljenost bakterija iz koljena *Proteobacteria* značajno smanjila od 4. do 24. tjedna laktacije. To je u skladu s drugim studijama prema kojima *Firmicutes* i *Proteobacteria* dominiraju u uzorcima mlijeka, ali se njihovi udjeli znatno mijenjaju ovisno o tjednu uzorkovanja. Također, pokazalo se da se brojnost bakterija iz roda *Staphylococcus* značajno smanjila od 1. do 4. tjedna (Lyons i sur., 2022).

Koagulaza-negativni stafilocoki, osobito *S. epidermidis*, nalaze se u 70-100 % zdravih uzoraka majčinog mlijeka i smatraju se dijelom normalne mikrobiote mlijeka ili kože. Međutim, oni također mogu biti oportunistički patogeni te se pokazalo da *S. epidermidis* prevladava u mlijeku žena s mastitisom, i to u većoj koncentraciji nego *S. aureus*. Implikacija da bi *S. epidermidis* mogao biti vodeći patogen u pojavi mastitisa dovodi do problema jer je vrlo vjerojatno da će *S. epidermidis* biti rezistentan na flukloksacilin, uobičajeni prvi izbor za liječenje mastitisa (Joubert i sur., 2022).

Mediano i sur. (2017) analizirali su 2 skupine uzoraka majčinog mlijeka žena koje boluju od mastitisa. U većini uzoraka dokazana je dominacija vrste *Staphylococcus epidermidis*. U preostalim uzorcima barem jedna od dominantnih vrsta bila vrsta *Streptococcus* (često iz vrsta *salivarius* ili *mitis*), dok je druga najdominantnija vrsta ili *S. aureus* ili *S. epidermidis*.

Kako bi se utvrdio udio *S. epidermidis* vrste u uzorcima majčinog mlijeka, provedeno je sekvencioniranje ukupne DNA iz uzoraka majčinog mlijeka. Zastupljenost vrste *S. epidermidis* u različitim fazama je promjenjiv te ovisi o periodu laktacije (slika 6).



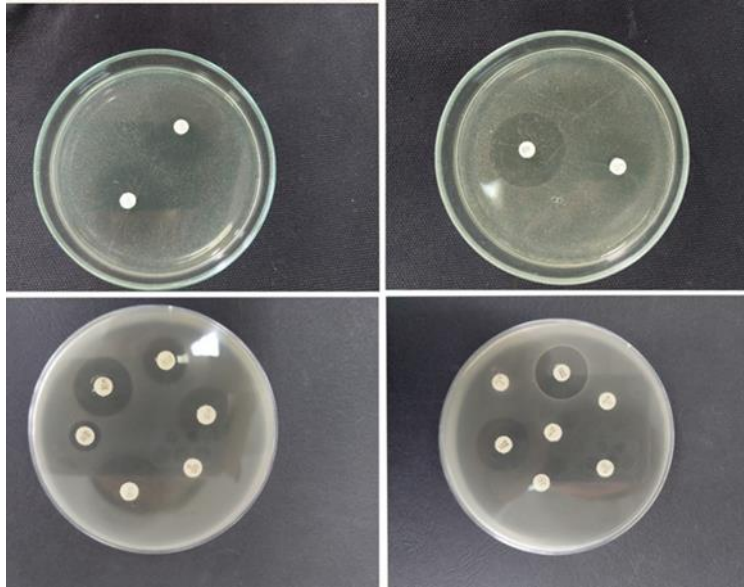
Slika 6. Grafički prikaz udjela *S. epidermidis* vrsta u mikrobioti majčinog mlijeka unutar tjedan dana nakon poroda, mjesec dana nakon poroda i mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu dojenčadi (podaci iz Banić i sur., 2022)

Delgado i sur. (2009) pokazali su kako sojevi *S. epidermidis* koji uzrokuju mastitis, ali i sojevi koji su izolirani iz mikrobiote majčinog mlijeka zdravih žena, pokazuju slične profile antibiotske osjetljivosti. Međutim, usporedbom rezultata ustanovljeno je da je veći postotak sojeva koji pokazuju sposobnost stvaranja biofilma i sojeva rezistentnih na mupirocin, eritromicin, klindamicin i oksacilin među sojevima izoliranim iz majčinog mlijeka žena koje imaju mastitis. Pojavnost rezistencije ovih sojeva proizlazi vjerojatno zbog povećane i nekontrolirane upotrebe antibiotika širokog spektra, koji doprinose pojavi višestruko rezistentnih bakterijskih sojeva. Neprikladna antibiotska terapija također može biti jedno od objašnjenja zašto stafilokokni mastitis često postaje kronična i/ili rekurentna infekcija (Delgado i sur., 2009).

Tablica 5. Zone inhibicije (mm) rasta *S. epidermidis* sojeva djelovanjem antibiotika.

Antibiotik \ Soj	Soj					
	MC5	AF2	AF4	MB6	RS8	RS17
Eritromicin	14 ± 1	0,0	24,3 ± 1,2	0,0	30,0 ± 2,0	16,3 ± 0,6
Streptomycin	10,3 ± 0,6	18,3 ± 3,1	21,0 ± 3,5	21,7 ± 5,5	24,0 ± 1,0	10,3 ± 0,5
Kloramfenikol	6,7 ± 0,6	34,3 ± 0,6	23,7 ± 5,8	23,0 ± 4,4	38,0 ± 2,0	11,0 ± 1,0
Vankomicin	15,0 ± 0,0	24,3 ± 1,2	17,0 ± 5,0	19,3 ± 4,0	27,3 ± 0,6	0,0
Gentamicin	10,0 ± 1,0	23,3 ± 1,5	19,3 ± 0,6	12,3 ± 4,0	22,7 ± 1,6	11,3 ± 0,5
Fosfomicin	10,0 ± 0,0	50,0 ± 0,0	24,7 ± 4,2	33,3 ± 2,8	36,7 ± 2,8	0,0
Klindamicin	13,7 ± 2,1	0,0	8,0 ± 1,0	31,7 ± 2,8	25,7 ± 2,5	19,3 ± 1,2
Klaritromicin	8,3 ± 0,6	0,0	12,0 ± 6,2	0,0	27,0 ± 2,6	17,3 ± 2,5
Azitromicin	7,0 ± 0,0	17,3 ± 2,5	29,3 ± 4,0	0,0	21,0 ± 1,0	15,3 ± 0,5
Tetraciklin	7,7 ± 0,6	21,3 ± 1,5	27,7 ± 2,5	20,0 ± 2,0	36,0 ± 1,0	0,0
Kanamycin	6,7 ± 0,6	20,3 ± 5,5	22,3 ± 3,2	18,7 ± 3,1	24,0 ± 1,0	7,6 ± 1,2
Ampicilin	16,0 ± 1,0	27,7 ± 0,6	11,7 ± 1,2	29,0 ± 1,0	29,7 ± 1,5	15,0 ± 0,0
Spiramicin	14,7 ± 0,6	13,0 ± 2,6	21,0 ± 2,6	19,0 ± 5,6	16,7 ± 1,2	12,6 ± 0,6

Određivanjem antibiotskih profila osjetljivosti sojeva *S. epidermidis* cilj je okarakterizirati fenotipske rezistencije među izolatima majčinog mlijeka (tablica 5). Na temelju rezultata prikazanih u tablici 5, može se ustanoviti da je učestalost fenotipske rezistencije niža. U skladu s Delgado i sur. (2009), ustanovljena je kod 2 od analiziranih 6 sojeva rezistencija na antibiotike eritromicin, te od ispitivanih 6 sojeva kod jednog soja fenotipska rezistencija na klindamicin. Također, kod sojeva *S. epidermidis* AF2, MB6 i RS17 utvrđena je rezistencija na 3 od 13 testiranih antibiotika.

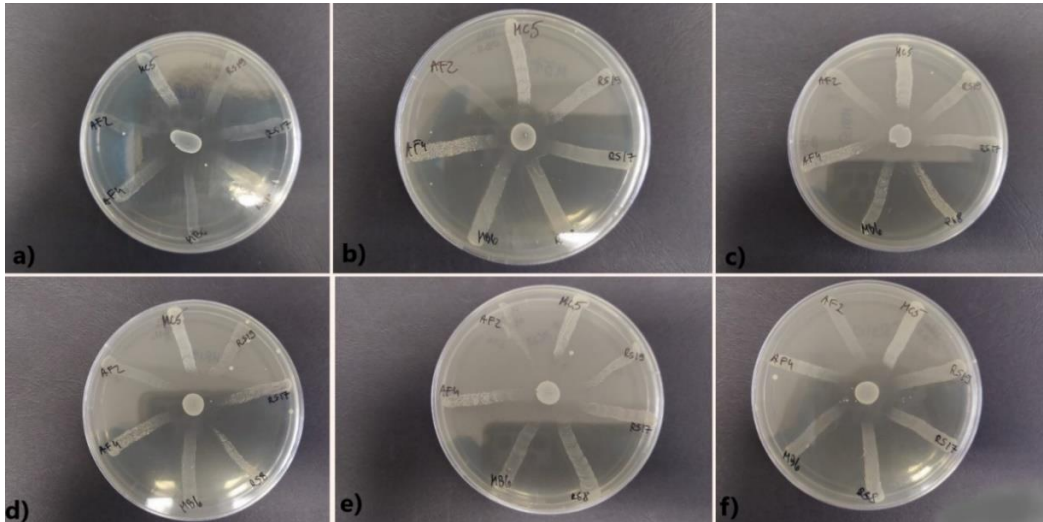


Slika 7. Prikaz zona inhibicije rasta *S. epidermidis* AF2, AF4 i MB6 sojeva djelovanjem antibiotika

4.2. INHIBICIJA RASTA *S. epidermidis* I *S. mitis* SOJEVA

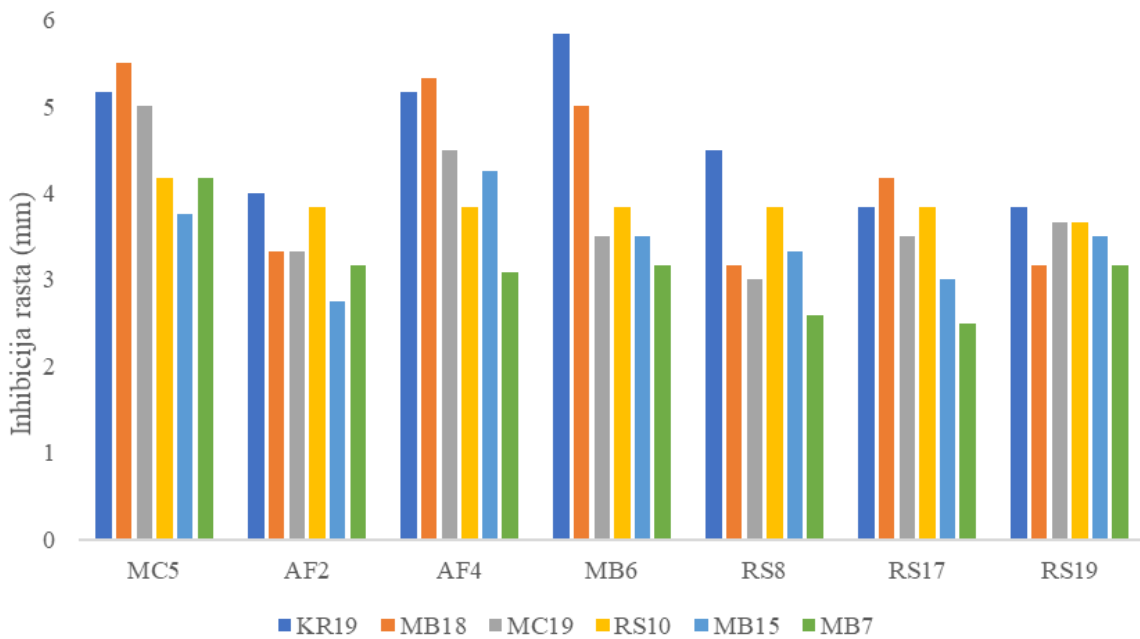
Višestruka otpornost na antibiotike, stvaranje biofilma i mehanizmi za izbjegavanje imunskog odgovora domaćina često se pojavljuju među kliničkim izolatima *S. epidermidis*. To objašnjava zašto je laktacijski mastitis vrlo često ne odgovara dobro na terapiju antibioticima i zašto predstavlja jedan od glavnih razloga za prestanak dojenja. U tom kontekstu, posebno je privlačan razvoj novih strategija za tretiranje mastitisa na bazi probiotika, kao alternativa ili nadopuna terapiji antibioticima (Fernández i sur., 2013).

Poznato je da BMK mogu inhibirati rast drugih mikroorganizama natječući se za hranjive tvari ili djelovanjem metaboličkih produkata kao što su organske kiseline, vodikov peroksid ili diacetil. Također, jedna od vrlo povoljnih karakteristika BMK koja omogućava dodatnu sposobnost inhibicije drugih bakterija je proizvodnja bakteriocina ili tvari sličnih bakteriocinima (Diepers i sur., 2017). Mohamed i sur. (2020) pokazali su kako sterilni supernatanti kulture probiotičkih sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* pokazuju obećavajuću inhibiciju svih izolata *S. aureus* ili *S. epidermidis*, čak i prema sojevima koji su pokazali rezistenciju na antibiotike. Nadalje, Bousmaha-Marroki i sur. (2021) procjenjivali su prisutnost antimikrobne aktivnosti odabranih probiotičkih sojeva prema *Staphylococcus* vrstama koje su uključeni u pojavu laktacijskog mastitisa kod žena. Pokazalo se da analizirani probiotički sojevi imaju mogućnost inhibicije rasta sojeva *S. aureus* i *S. epidermis*. Također, Arroyo i sur. (2010) istraživali su učinak *Lactobacillus* vrsta izoliranih iz majčinog mlijeka u tretiranju mastitisa kod žena. Pokazalo se da je došlo do statistički značajnog smanjenja ukupnog broja bakterija *S. epidermidis* u dvije skupine koje su koristile probiotički pripravak. Većina žena iz skupine koja je uzimala probiotike (88 % skupine A i 85 % skupine B) imala je kompletan oporavak na kraju ispitivanja, dok je ostatak (12 % skupine A i 14 % skupine B) prijavio blagu nelagodu pri dojenju. Primjena probiotika rezultirala je smanjenjem broja bakterija u mlijeku i brzim poboljšanjem stanja.



Antagonističko djelovanje **A)** soja MB18 na rast *S. epidermidis*. **B)** soja MB7 na rast *S. epidermidis*. **C)** soja MB15 na rast *S. epidermidis*. **D)** soja KR19 na rast *S. epidermidis*. **E)** soja MC19 na rast *S. epidermidis*. **F)** soja RS10 na rast *S. epidermidis*.

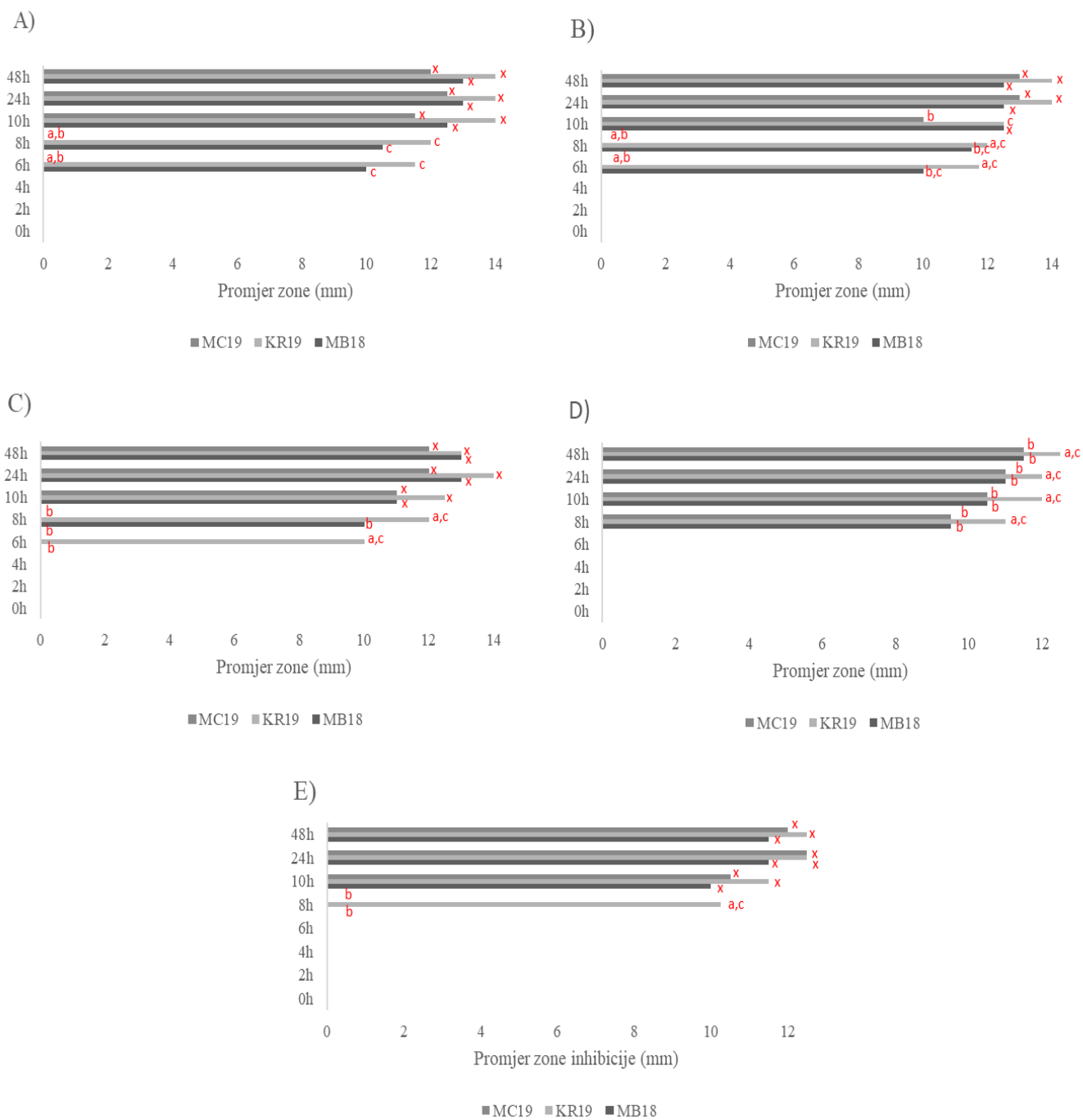
Slika 8. Zone inhibicije rasta *S. epidermidis* sojeva i *S. mitis* soja djelovanjem *L. plantarum* sojeva



Slika 9. Prikaz inhibicije rasta (mm) sojeva *S. epidermidis* MC5, *S. epidermidis* AF2, *S. epidermidis* AF4, *S. epidermidis* MB6, *S. epidermidis* RS8, *S. epidermidis* RS17 i *S. mitis* RS19 soja djelovanjem *L. plantarum* MB18, *L. plantarum* MB7, *L. plantarum* MB15, *L. plantarum* KR19, *L. plantarum* MC19, *L. plantarum* RS10

Za određivanje antistafilokoknog učinka *L. plantarum* sojeva provedena je analiza inhibicije rasta *S. epidermidis* i *S. mitis* sojeva koji se povezuju s pojavom mastitisa kod roditelja, metodom radijalnih crta (slika 8). Prema rezultatima prikazanih na slici 9, svi analizirani sojevi *L. plantarum* iskazuju mogućnost inhibicije rasta *S. epidermidis* i *S. mitis* sojeva. Nakon statističke obrade podataka utvrđeno je da su statistički značajnu inhibiciju rasta prema odabranim *S. epidermidis* sojevima i soju *S. mitis* u odnosu na ostale sojeve pokazali sojevi *L. plantarum* MB18, *L. plantarum* KR19 i *L. plantarum* MC19. Stoga su ta tri soja odabrana za daljnju analizu antistafilokoknog učinka na sojeve *S. epidermidis* tijekom 48-satnog perioda.

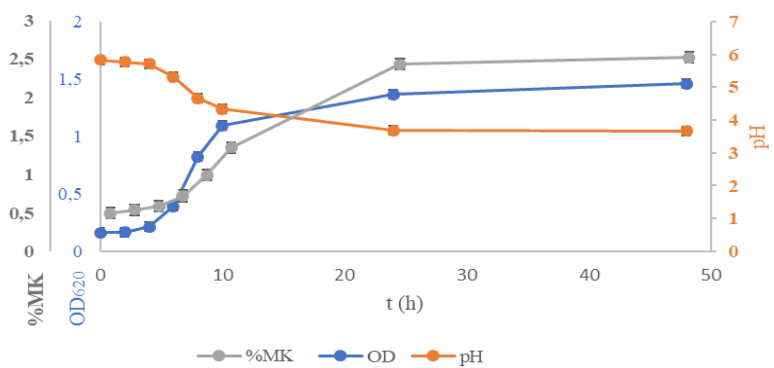
Iz prikazanih rezultata na slici 10 može se zaključiti da je antimikrobna aktivnost detektirana već nakon 6 ili 8 h inkubacije, što vremenski odgovara logaritamskoj fazi rasta *L. plantarum*. Maksimalna antimikrobna aktivnost zabilježen je nakon 24 i 48 h kultivacije, što se podudara sa stacionarnom fazom rasta. Tijekom bakterijskog rasta, pH vrijednost medija se smanjivala do stacionarne faze. Smanjenje pH prati povećanje koncentracije mliječne kiseline, čija koncentracija raste do početka stacionarne faze rasta (slika 11). Antimikrobna aktivnost rezultat je, u određenoj mjeri, proizvodnje mliječne kiseline, a dijelom se pripisuje djelovanju antimikrobnih peptida, plantaricina, koje proizvode određeni sojevi *L. plantarum*. Nakon statističke analize podataka, soj koji je pokazao najznačajniju antimikrobnu aktivnost je *L. plantarum* KR19.



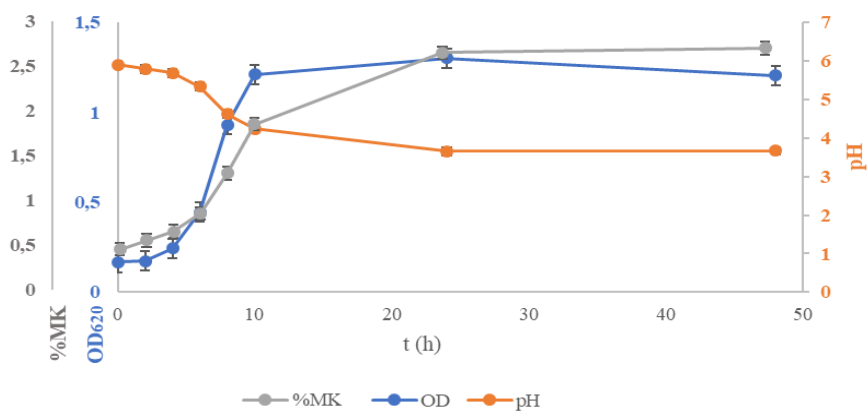
Statistički značajna razlika zone inhibicije u odnosu na soj *L. plantarum* MB18 – a, statistički značajna razlika zone inhibicije u odnosu na soj *L. plantarum* KR19 – b, statistički značajna razlika zone inhibicije u odnosu na soj *L. plantarum* MC19 – c, nema statistički značajne razlike zone inhibicije među sojevima – x

Slika 10. Grafički prikaz promjera zona inhibicije rasta *S. epidermidis* sojeva djelovanjem supernatanata bez stanica *L. plantarum* MB18, KR19 i MC19 sojeva prikupljenih u određenim vremenskim intervalima A) *S. epidermidis* MC5 B) *S. epidermidis* AF2 C) *S. epidermidis* AF4 D) *S. epidermidis* MB6 E) *S. epidermidis* RS8

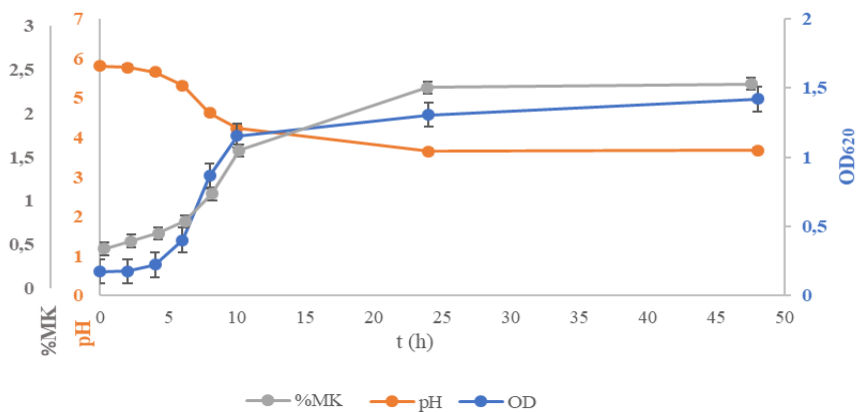
A)



B)



C)



A) *L. plantarum* MB18 B) *L. plantarum* KR19 C) *L. plantarum* MC19

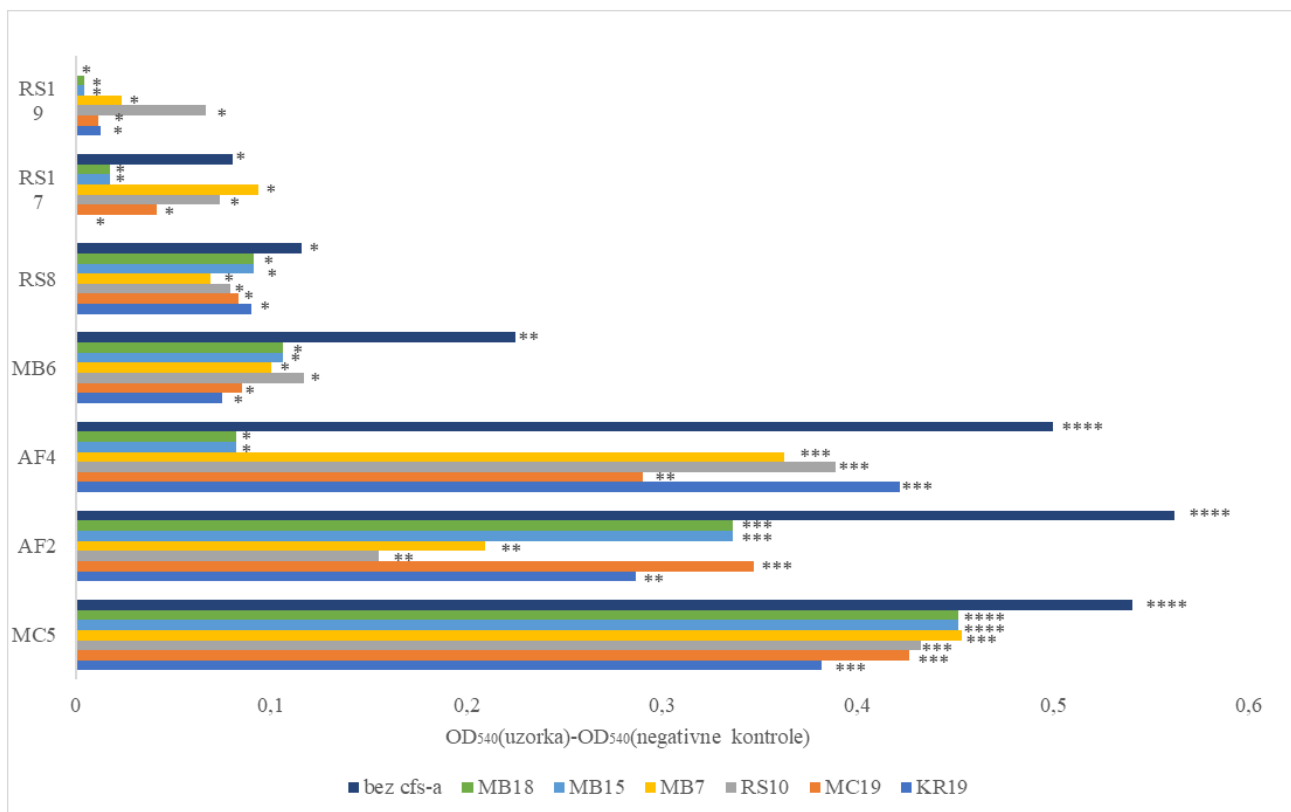
Slika 11. Grafički prikaz parametara tijekom staničnog rasta (% mliječne kiseline, OD₆₂₀ i pH) u MRS mediju pri 37 °C tijekom 48 sati

4.3. INHIBICIJA FORMIRANJA BIOFILMA *Staphylococcus* SOJEVA

Prilikom adaptacije na stresne uvjete mikrookoliša, bakterije poput stafilokoka i streptokoka, mogu aktivno formirati visoko organizirane i gusto naseljene zajednice, biofilmove, na epitelima. Biofilmovi imaju zaštitnu funkciju tvorenjem slojeva, što poboljšava otpor bakterijskih stanica na antibiotike i imunosti odgovor domaćina uz nesmetano razmnožavanje bakterija. Obzirom na kompetitivnu ekskluziju probiotičkih bakterija prema patogenim vrstama, predmet mnogih istraživanja je inhibicijski učinak *Lactobacillus* vrsta izoliranih iz majčinog mlijeka sve s ciljem razvoja alternativne opcije liječenja infektivnog mastitisa. Ustanovljeno je da su izolirane BMK iz majčinog mlijeka imale potencijal za sprječavanje infekcija dojke (Bergmann i sur., 2014). *S. epidermidis* može biti oportunistički patogen koji stvara biofilmove koji su poznati po svojoj otpornosti. Sukladno tome, mogu izbjeći mehanizme imunosti odgovora i djelovanje različitih antibiotika. Nekoliko gena koji kodiraju stvaranje biofilma i rezistenciju na antibiotike ključni su mehanizmi patogenezе *S. epidermidis* (Hindieh i sur., 2022).

Frickmann i sur. (2018) usredotočili su se na identifikaciju i kvantifikaciju inhibicijskih učinaka supernatanta kulture iz poznatih probiotičkih bakterija na planktonski rast i formaciju biofilma te rast već formiranog biofilma stafilokoka. Prema rezultatima mjerenja OD₆₀₀, stvaranje biofilma *S. epidermidis* očito je smanjeno zbog supernatanta kulture, a taj se učinak povećavao s povećanjem koncentracije supernatanta kulture probiotičke bakterije. Nadalje, inhibicijski učinak uvelike ovisi o statusu biofilma. Općenito, pokazalo se da je puno lakše postići učinke inhibicije na tek nastalim biofilmovima nego na već formiranim i zrelim biofilmovima.

S. mitis pokazao je najmanju sposobnost formiranja biofilma, dok većina ostalih *S. epidermidis* sojeva pokazuje veću sposobnost formiranja biofilma. Iz rezultata prikazanih na slici 12 proizlazi mogućnost inhibicije formiranja biofilma *S. epidermidis* sojeva supernatantom kulture koji je bez stanica *L. plantarum* sojeva jer je formiranje biofilma puno značajnije kada nema inkubacije sa supernatantom bez stanica. Takvi rezultati pokazuju potencijal probiotičkih sojeva iz majčinog mlijeka za prevenciju ili čak terapiju mastitisa kod dojilja uzrokovanog *S. epidermidis* sojevima.

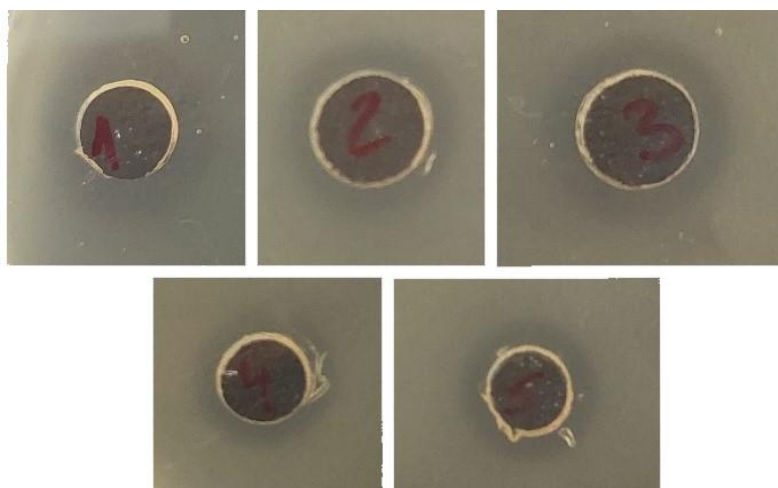


* OD_{uz}-OD_{NK}> 0, ** OD_{uz}-OD_{NK} > OD_{NK}, *** OD_{uz}-OD_{NK} > 2xOD_{NK}, **** OD_{uz}-OD_{NK} > 3xOD_{NK}.

Slika 12. Grafički prikaz inhibicije stvaranja biofilma *S. epidermidis* i *S. mitis* sojeva djelovanjem CFS-a *L. plantarum* sojeva

4.2. BAKTERIOCINSKI POTENCIJAL *L. plantarum*

Važan korak u karakterizaciji bakteriocina i antimikrobnih spojeva sličnih bakteriocinima je primjena proteolitičkih enzima za procjenu proteinske strukture. Budući da su bakteriocini okarakterizirani kao antimikrobni peptidi, očekuje se da će doći do gubitka antimikrobne aktivnosti nakon tretmana s enzimima kao što su tripsin, pankreatin, papain i pepsin (Pereira i sur., 2022). Djelovanjem supernatanta bez stanica došlo je do inhibicije rasta odabranih *S. epidermidis* sojeva (slika 13). Iz rezultata prikazanih u tablici 6, vidljivo je da se kod određenih *L. plantarum* sojeva zona inhibicije nakon tretmana supernatanta statistički značajno razlikuje od zone inhibicije prije tretiranja supernatanta. Antimikrobna aktivnost se u određenoj mjeri pripisuje djelovanju proizvedene mliječne kiseline, a smanjenje zone inhibicije nakon tretmana supernatanta proteinazama i temperaturom ukazuje na proizvodnju antimikrobnih peptida (plantaricina) ispitivanih sojeva *L. plantarum*. Banić i sur. (2022) potvrdili su PCR analizom da su sojevi *L. plantarum* KR19, MC19, MB7, MB15, MB18 i RS10, od kojih su neki korišteni u ovom radu, potencijalni proizvođači plantaricina jer sadrže gene plnA, plnEF i plnJ odgovorne za proizvodnju plantaricina PlnA, PlnEF i peptida PlnJ te plantaricina PlnJK. Osim antimikrobnog djelovanja, plantaricin je pokazao djelovanje na zdravim i kancerogenim epitelnim intestinalnim staničnim linijama povećanjem održivosti zdrave stanice i smanjenjem proliferacije stanica raka.



1) Bez tretmana supernatanta; 2) Tretman supernatanta pepsinom; 3) Tretman supernatanta temperaturom; 4) Tretman supernatanta proteinazom K; 5) Tretman supernatanta pankreatinom

Slika 13. Osjetljivost antimikrobne aktivnosti *L. plantarum* MB18 na temperaturu i proteolitičke enzime

Slično, Mohamed i sur. (2020) pokazali su kako šest sojeva probiotičkih vrsta *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* spp. inhibira rast svih izolata *S. aureus* i *S. epidermidis*. Djelovanje probiotičkih supernatanta bez stanica pripisuje se aktivnosti antimikrobnih peptida, tj. bakteriocina ili sniženom pH zbog proizvodnje mliječne kiseline. Nadalje, Bousmaha-Marroki i sur. (2021) primijetili su inaktivaciju antimikrobne aktivnosti nakon tretmana s proteinazom K, što ukazuje na proteinsku prirodu antimikrobnih spojeva koji se oslobađaju u supernatant. To ukazuje da je antibakterijsko djelovanje laktobacila uzrokovano proizvodnjom bakteriocina i ne može biti samo povezan s acidifikacijom i proizvodnjom mliječne kiseline. Diepers i sur. (2017) pokazali su osjetljivost supernatanta na pepsin što također ukazuje na postojanje bakteriocina ili tvari slične bakteriocinu.

Tablica 6. Utjecaj visoke temperature i proteolitičkih enzima na antimikrobno djelovanje *L. plantarum* MB18, *L. plantarum* KR19, *L. plantarum* MC19

soj <i>L. plantarum</i>	Metoda tretiranja supernatanta	Promjer zona inhibicije				
		MC5	AF2	AF4	MB6	RS8
MB18	Bez tretmana	11,75 ± 0,35	12,5 ± 1,41	11,25 ± 0,35	13 ± 0,00	12,25 ± 1,06
	Pepsin	10,5 ± 0,00	12 ± 1,41	10,5 ± 0,71	10,5 ± 0,71*	11,25 ± 1,06
	Temperatura	11 ± 1,41	12 ± 1,41	10,5 ± 0,71	11,5 ± 0,71*	11,25 ± 0,35
	Proteinaza K	9,75 ± 0,35*	10,75 ± 1,06	10 ± 0,71	11,5 ± 0,71*	10,5 ± 0,71
	Pankreatin	13,25 ± 0,70	11,75 ± 1,77	10,75 ± 0,35	12,25 ± 0,35	12 ± 1,41
KR19	Bez tretmana	13,5 ± 0,71	14 ± 2,12	11,75 ± 0,71	13,25 ± 1,06	12 ± 1,41
	Pepsin	11 ± 1,06	11,5 ± 1,06*	11 ± 1,41	11,5 ± 0,71*	11 ± 0,71
	Temperatura	11 ± 0,71	11,5 ± 0,71*	11 ± 1,41	11,75 ± 1,06*	10,75 ± 0,35
	Proteinaza K	11,25 ± 1,06	11,75 ± 1,77*	10,25 ± 1,06	11 ± 0,71*	11 ± 1,41
	Pankreatin	10,5 ± 0,71*	11,5 ± 0,71*	10,75 ± 0,71	12 ± 0,00	11,5 ± 1,41
MC19	Bez tretmana	12,5 ± 0,35	11,5 ± 0,71	12 ± 0,00	11,5 ± 0,71	12,5 ± 0,71
	Pepsin	10,75 ± 0,35	11 ± 0,00	10,75 ± 0,35	9,75 ± 0,35	11,5 ± 0,35
	Temperatura	10,5 ± 0,00	11,5 ± 0,71	10,75 ± 0,35	11 ± 0,71	12 ± 2,12
	Proteinaza K	10,25 ± 0,35	10,25 ± 0,35	9,75 ± 1,06	10,5 ± 0,71	11,25 ± 0,35
	Pankreatin	11 ± 0,71	10,75 ± 1,06	10,25 ± 1,06	10,5 ± 0,71	11,5 ± 0,71

*Zona inhibicije nakon tretmana supernatanta se statistički značajno razlikuje od zone inhibicije prije tretiranja supernatanta

5. ZAKLJUČCI

1. Sojevi *S. epidermidis* iz mikrobiote majčinog mlijeka pokazuju nisku učestalost fenotipske rezistencije na antibiotike.
2. *L. plantarum* sojevi iskazuju antimikrobno djelovanje prema sojevima *S. epidermidis* i *S. mitis* što proizlazi iz inhibicije rasta tijekom kokultivacije te tijekom formiranja biofilma.
3. Sojevi *L. plantarum* MB18, *L. plantarum* KR19 i *L. plantarum* MC19 iskazuju mogućnost proizvodnje antimikrobnih peptida – plantaricina.

6. LITERATURA

- Acedo JZ, Chiorean S, Vederas JC, van Belkum MJ (2018) The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **42**, 805–828. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy033>
- Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Angelopoulou A, Field D, Ryan CA, Stanton C, Hill C, Ross RP (2018) The microbiology and treatment of human mastitis. *Med Microbiol Immunol* **207**, 83–94. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0532-z>
- Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM (2010) Treatment of infectious mastitis during lactation: Antibiotics versus oral administration of *lactobacilli* isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* **50**, 1551–1558. <https://doi.org/10.1086/652763>
- Balciunas EM, Castillo Martinez FA, Todorov SD, Franco BDG de M, Converti A, Oliveira RP de S (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* **32**, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
- Banić M (2021) Potencijalne terapijske biomolekule probiotičkih sojeva autohtonih bakterija mliječne kiseline (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Banić M, Butorac K, Čuljak N, Leboš Pavunc A, Novak J, Bellich B, i sur. (2022) The Human Milk Microbiota Produces Potential Therapeutic Biomolecules and Shapes the Intestinal Microbiota of Infants. *Int J Mol Sci* **23**. <https://doi.org/10.3390/ijms232214382>
- Bergmann H, Rodríguez JM, Salminen S, Szajewska H (2014) Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: A workshop report. *Br J Nutr* **112**, 1119–1128. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001949>

- Bousmaha-Marroki L, Boutillier D, Marroki A, Grangette C (2021) In Vitro Anti-staphylococcal and Anti-inflammatory Abilities of *Lacticaseibacillus rhamnosus* from Infant Gut Microbiota as Potential Probiotic Against Infectious Women Mastitis. *Probiotics Antimicrob Proteins* **13**, 970–981. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09755-x>
- Büttner H, Mack D, Rohde H (2015) Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: Mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol* **5**, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00014>
- Carr LE, Virmani MD, Rosa F, Munblit D, Matazel KS, Elolimy AA, i sur. (2021) Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. *Front Immunol* **12**, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.604080>
- Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, i sur. (2014) In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYN BIO® against pathogens. *J Appl Microbiol* **117**, 518–527. <https://doi.org/10.1111/jam.12544>
- de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Magalhães Júnior AI, Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv* **36**, 2060–2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
- Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Marín ML, Del Campo R, Fernández L, i sur. (2009) *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: Potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiol* **9**, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-82>
- Demmelmair H, Jiménez E, Collado MC, Salminen S, McGuire MK (2020) Maternal and perinatal factors associated with the human milk microbiome. *Curr Dev Nutr* **4**, 1–14. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzaa027>
- Diepers AC, Krömker V, Zinke C, Wente N, Pan L, Paulsen K, i sur. (2017) In vitro ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. *Sustain Chem Pharm* **5**, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2016.06.002>

- Esteban J, Molina-Manso D, Spiliopoulou I, Cordero-Ampuero J, Fernández-Roblas R, Foka A, i sur. (2010) Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. *Acta Orthop* **81**, 674–679.
<https://doi.org/10.3109/17453674.2010.537810>
- Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, i sur. (2013) The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* **69**, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.001>
- Fernández L, Pannaraj PS, Rautava S, Rodríguez JM (2020) The Microbiota of the Human Mammary Ecosystem. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 1–24.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.586667>
- Frickmann H, Klenk C, Warnke P, Redanz S, Podbielski A (2018) Influence of probiotic culture supernatants on in vitro biofilm formation of *staphylococci*. *Eur J Microbiol Immunol* **8**, 119–127. <https://doi.org/10.1556/1886.2018.00022>
- Gomez-Gallego C, Garcia-Mantrana I, Salminen S, Collado MC (2016) The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Semin Fetal Neonatal Med* **21**, 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2016.05.003>
- Gonzalez E, Brereton NJB, Li C, Lopez Leyva L, Solomons NW, Agellon LB, i sur. (2021) Distinct Changes Occur in the Human Breast Milk Microbiome Between Early and Established Lactation in Breastfeeding Guatemalan Mothers. *Front Microbiol* **12**, 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557180>
- Granger CL, Embleton ND, Palmer JM, Lamb CA, Berrington JE, Stewart CJ (2021) Maternal breastmilk, infant gut microbiome and the impact on preterm infant health. *Acta Paediatr Int J Paediatr* **110**, 450–457. <https://doi.org/10.1111/apa.15534>
- Hassan M, Kjos M, Nes IF, Diep DB, Lotfipour F (2012) Natural antimicrobial peptides from bacteria: Characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* **113**, 723–736. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x>

- Hindieh P, Yaghi J, Khoury A El, Chokr A, Atoui A, Louka N, i sur. (2022) *Lactobacillus rhamnosus* and *Staphylococcus epidermidis* in gut microbiota: in vitro antimicrobial resistance. *AMB Express* **12**. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01468-w>
- Jiménez E, Fernández L, Maldonado A, Martín R, Olivares M, Xaus J, i sur. (2008) Oral Administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4650–4655. <https://doi.org/10.1128/AEM.02599-07>
- Joubert IA, Otto M, Strunk T, Currie AJ (2022) Look Who’s Talking: Host and Pathogen Drivers of *Staphylococcus epidermidis* Virulence in Neonatal Sepsis. *Int J Mol Sci* **23**. <https://doi.org/10.3390/ijms23020860>
- Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Miguel Rodríguez J, Boza J, Xaus J (2007) Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr* **98**, 96–100. <https://doi.org/10.1017/S0007114507832910>
- Łubiech K, Twarużek M (2020) *Lactobacillus* bacteria in breast milk. *Nutrients* **12**, 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu12123783>
- Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C (2020) Breast milk, a source of beneficial microbes and associated benefits for infant health. *Nutrients* **12**, 1–30
- Lyons KE, Shea CAO’, Grimaud G, Ryan CA, Dempsey E, Kelly AL, i sur. (2022) The human milk microbiome aligns with lactation stage and not birth mode. *Sci Rep* **12**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09009-y>
- Ma R, Hu X, Zhang X, Wang W, Sun J, Su Z, i sur. (2022) Strategies to prevent, curb and eliminate biofilm formation based on the characteristics of various periods in one biofilm life cycle. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1003033>
- Malik A, Erginkaya Z, Erten H (2019) Health and safety aspects of food processing technologies. *Heal Saf Asp Food Process Technol* 1–672. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-24903-8>

- Mediano P, Fernández L, Jiménez E, Arroyo R, Espinosa-Martos I, Rodríguez JM, i sur. (2017) Microbial Diversity in Milk of Women with Mastitis: Potential Role of Coagulase-Negative *Staphylococci*, Viridans Group *Streptococci*, and *Corynebacteria*. *J Hum Lact* **33**, 309–318. <https://doi.org/10.1177/0890334417692968>
- Mohamed S, Elmohamady MN, Abdelrahman S, Amer MM, Abdelhamid AG (2020) Antibacterial effects of antibiotics and cell-free preparations of probiotics against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* associated with conjunctivitis. *Saudi Pharm J* **28**, 1558–1565. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.10.002>
- Murphy K, Curley D, O’callaghan TF, O’shea CA, Dempsey EM, O’toole PW, i sur. (2017) The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Sci Rep* **7**, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep40597>
- Pereira WA, Piazzentin ACM, de Oliveira RC, Mendonça CMN, Tabata YA, Mendes MA, i sur. (2022) Bacteriocinogenic probiotic bacteria isolated from an aquatic environment inhibit the growth of food and fish pathogens. *Sci Rep* **12**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09263-0>
- Rautava S (2016) Early microbial contact, the breast milk microbiome and child health. *J Dev Orig Health Dis* **7**, 5–14. <https://doi.org/10.1017/S2040174415001233>
- Rodríguez JM, Fernández L (2017) Infectious Mastitis During Lactation: A Mammary Dysbiosis Model, 1. izd, Elsevier Inc., str. 401-428.
- Sand SL, Nissen-Meyer J, Sand O, Haug TM (2013) Plantaricin A, a cationic peptide produced by *Lactobacillus plantarum*, permeabilizes eukaryotic cell membranes by a mechanism dependent on negative surface charge linked to glycosylated membrane proteins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1828**, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.001>
- Schilcher K, Horswill AR (2020) *Staphylococcal* Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol Mol Biol Rev* **84**. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>

- Sharma C, Singh BP, Thakur N, Gulati S, Gupta S, Mishra SK, i sur. (2017) Antibacterial effects of *Lactobacillus* isolates of curd and human milk origin against food-borne and human pathogens. *3 Biotech* **7**, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0591-7>
- Simons A, Alhanout K, Duval RE (2020) Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms* **8**. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>
- Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I (2013) Human milk metagenome: A functional capacity analysis. *BMC Microbiol* **13**. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-116>
- Wu A, Fu Y, Kong L, Shen Q, Liu M, Zeng X, i sur. (2021) Production of a Class IIb Bacteriocin with Broad-spectrum Antimicrobial Activity in *Lactiplantibacillus plantarum* RUB1. *Probiotics Antimicrob Proteins* **13**, 1820–1832. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09815-2>
- Zacharof MP, Lovitt RW (2012) Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* **2**, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Helena Rak izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis